

Untersuchung der Wirkung des Phosphodiesterase-Inhibitors Sildenafil in Kombination mit Chemotherapie beim Pankreaskarzinom

Julia Rebecca Link

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Grades eines **Dr. med. vet.**
beim Fachbereich Veterinärmedizin der
Justus-Liebig-Universität Gießen



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.

Jede Verwertung ist ohne schriftliche Zustimmung des Autors oder des Verlages unzulässig. Das gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen und die Einspeicherung in und Verarbeitung durch elektronische Systeme.

1. Auflage 2013

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted, in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise, without the prior written permission of the Author or the Publishers.

1st Edition 2013

© 2013 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen

Printed in Germany



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

STAUFENBERGRING 15, D-35396 GIESSEN
Tel: 0641-5599888 Fax: 0641-5599890
email: redaktion@doktorverlag.de

www.doktorverlag.de

Aus dem Klinikum Veterinärmedizin,
Klinische Pathophysiologie und Klinische Laboratoriumsdiagnostik
der Justus – Liebig – Universität Gießen
Betreuer: Prof. Dr. Andreas Moritz
und
der Chirurgischen Klinik
der Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg
Betreuer: Prof. Dr. Alexandr V. Bazhin

Untersuchung der Wirkung des Phosphodiesterase- Inhibitors Sildenafil in Kombination mit Chemotherapie beim Pankreaskarzinom

Inaugural – Dissertation

zur Erlangung des Grades eines
Dr. med. vet.
beim Fachbereich Veterinärmedizin
der Justus – Liebig – Universität Gießen

eingereicht von

Julia Rebecca Link

Tierärztin aus Bad Friedrichshall

Gießen 2013

Mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Dekan: Prof. Dr. Dr. h.c. Martin Kramer

Gutachter: Prof. Dr. med. vet. Andreas Moritz
Prof. Dr. Alexandr V. Bazhin

Tag der Disputation: 13. Juni 2013

Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre: „Ich habe die vorgelegte Dissertation selbständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.“

Meinen Eltern

I. Inhaltsverzeichnis

| | |
|--------------------------------|---|
| I. Inhaltsverzeichnis..... | V |
| II. Abkürzungsverzeichnis..... | 8 |

1. Einleitung..... 11

| | |
|---|----|
| 1.1. Das Immunsystem..... | 11 |
| 1.1.1. Zellen des Immunsystems..... | 11 |
| 1.1.1.1. NK- und NKT-Zellen..... | 12 |
| 1.1.1.2. Lymphozyten..... | 12 |
| 1.1.1.2.1. T-Helferzellen (CD4 ⁺)..... | 14 |
| 1.1.1.2.2. Zytotoxische T-Zellen (CD8 ⁺)..... | 14 |
| 1.1.1.3. Dendritische Zellen..... | 15 |
| 1.1.1.4. Regulatorische Zellen..... | 16 |
| 1.1.1.4.1. T _{reg} | 16 |
| 1.1.1.4.2. Myeloide Suppressorzellen..... | 18 |
| 1.1.1.4.2.1. Wirkung von Sildenafil..... | 20 |
| 1.2. Das Pankreaskarzinom..... | 21 |
| 1.2.1. Ätiologie und Risikofaktoren..... | 22 |
| 1.2.2. Diagnose..... | 23 |
| 1.2.3. Staging und Prognose..... | 25 |
| 1.3. Therapie des Pankreaskarzinoms..... | 26 |
| 1.3.1. Chirurgische Therapie..... | 26 |
| 1.3.2. Chemotherapie..... | 27 |
| 1.3.3. Strahlentherapie..... | 28 |
| 1.3.4. Immuntherapie..... | 28 |
| 1.4. Ziele der vorliegenden Arbeit..... | 29 |

| | |
|---|-----------|
| 2. Material und Methoden..... | 30 |
| 2.1. Material..... | 30 |
| 2.1.1. Mäuse..... | 30 |
| 2.1.2. Pankreaskarzinomzellen..... | 30 |
| 2.1.3. Anästhetika..... | 30 |
| 2.1.4. Nichtsteroidale Antiphlogistika..... | 30 |
| 2.1.5. Antikörper für die Durchflusszytometrie ("anti-mouse")..... | 30 |
| 2.1.6. Antikörper für die Durchflusszytometrie ("anti-human")..... | 31 |
| 2.1.7. Streptavidin für die Durchflusszytometrie..... | 33 |
| 2.1.8. Laborgeräte..... | 33 |
| 2.1.9. Verbrauchsmaterialien..... | 34 |
| 2.1.10. Chemikalien..... | 34 |
| 2.1.11. Lösungen..... | 35 |
| 2.1.11.1. Puffer für die Durchflusszytometrie..... | 35 |
| 2.1.11.2. Medien und Lösungen für die Zellkultur..... | 35 |
| 2.1.12. Software..... | 36 |
| 2.2. Methoden..... | 36 |
| 2.2.1. Das orthotope Mausmodell..... | 36 |
| 2.2.1.1. Behandlung mit Sildenafil und Gemcitabin..... | 37 |
| 2.2.2. Präparation von Tumorgewebe und lymphatischer Organe..... | 37 |
| 2.2.3. Herstellung von Einzelzellsuspensionen..... | 38 |
| 2.2.4. Durchflusszytometrie..... | 38 |
| 2.2.4.1. Extrazelluläre FACS-Färbung..... | 39 |
| 2.2.4.2. Intrazelluläre FACS-Färbung..... | 39 |
| 2.2.5. Kultivierung von humanen Leukozyten aus dem peripheren Blut mit Sildenafil ex vivo..... | 40 |

| | |
|---|-----------|
| 3. Ergebnisse..... | 42 |
| 3.1. Effekte von Sildenafil auf das Tumorwachstum, die Metastasierungsrate und das Überleben der Mäuse mit Pankreaskarzinom..... | 42 |
| 3.1.1. Effekte auf das Überleben..... | 42 |
| 3.1.2. Effekte auf Tumolvolumen und Tumorgroße..... | 44 |
| 3.1.3. Effekte auf die Metastasierungsrate..... | 45 |
| 3.2. Phänotypische Charakterisierung von Leukozyten in Tumoren nach der Behandlung mit Sildenafil..... | 45 |
| 3.3. Phänotypische Charakterisierung von Leukozyten in gesunden Mäusen nach der Behandlung mit Sildenafil..... | 60 |
| 3.4. Analysen der Effekte von Sildenafil ex vivo..... | 70 |
| 3.5. Effekte der Kombination von Sildenafil und Chemotherapie (Gemcitabin) auf das Tumorwachstum, die Metastasierungsrate und das Überleben der tumortragenden Mäuse..... | 80 |
| 3.5.1. Effekte auf das Überleben..... | 80 |
| 3.5.2. Effekte auf Tumolvolumen und Tumorgroße..... | 82 |
| 3.5.3. Effekte auf die Metastasierungsrate..... | 82 |
| 3.6. Phänotypische Charakterisierung von Leukozyten in Tumoren nach der kombinierten Behandlung..... | 83 |
| 4. Diskussion..... | 91 |
| 5. Zusammenfassung..... | 97 |
| 6. Summary..... | 98 |
| III. Literaturverzeichnis..... | 99 |
| IV. Tabellenverzeichnis..... | 111 |
| V. Abbildungsverzeichnis..... | 112 |
| VI. Danksagungen..... | 116 |

II. Abkürzungsverzeichnis

| | |
|-----------------|--|
| % | Prozent |
| °C | Grad Celsius |
| µg | Mikrogramm |
| µl | Mikroliter |
| µm | Mikrometer |
| µM | Mikromolar |
| 5-FU | 5-Fluorouracil |
| α | Alpha |
| Abb. | Abbildung |
| ABC-Transporter | ATP-binding cassette transporter |
| AC | Adenylylcyclase |
| ANOVA | Analysis of Variance, Varianzanalyse |
| APC | Antigenpräsentierende Zelle |
| APC-Cy | Allophycocyanin-Cyanin |
| Arg | Arginase |
| ATP | Adenosintriphosphat |
| β | Beta |
| bzw. | beziehungsweise |
| γ | Gamma |
| ca. | ungefähr, circa |
| cAMP | cyclisches Adenosinmonophosphat |
| CD | cluster of differentiation |
| cDC | conventional DC, konventionelle DC |
| cGMP | cyclisches Guanosinmonophosphat |
| CT | Computertomographie |
| DC | dendritische Zelle |
| DNA | Desoxyribonucleinsäure |
| EDTA | Ethylendiamintetraessigsäure |
| ERCP | Endoskopisch retrograde Cholangio-Pankreatikographie |
| ESPAC | European Study Group for Pancreatic Cancer |

| | |
|-------------------|--|
| FACS | fluorescence activated cell sorting |
| FITC | Fluoresceinisothiocyanat |
| FoxP3 | Forkhead-Box-Protein P3 |
| FSC | forward scatter |
| g | Gramm |
| Gem | Gemcitabin |
| GM-CSF | granulocyte macrophage colony-stimulating factor |
| HLA | Human Leukocyte Antigen |
| i.p. | intraperitoneal |
| IFN | Interferon |
| IL | Interleukin |
| iNOS | Induzierbare Stickstoffmonoxid-Synthase |
| IPMN | Intraductale papilläre muzinöse Neoplasie |
| iT _{reg} | induzierte T _{reg} |
| kg | Kilogramm |
| KG | Körpergewicht |
| LCA | Leukocyte Common Antigen |
| MDSC | Myeloid derived suppressor cells |
| MFI | Mean fluorescence intensity |
| mg | Milligramm |
| MHC | Major Histocompatibility Complex |
| min | Minute |
| ml | Milliliter |
| mm | Millimeter |
| mm ³ | Kubikmillimeter |
| mM | Millimolar |
| mRNA | messenger RNA |
| MRT | Magnetresonanztomographie |
| MZN | Muzinöse zystische Neoplasie |
| n | Anzahl |
| NCAM | Neural cell adhesion molecule |
| NK-T-Zelle | natürliche Killer-T-Zelle |
| NK-Zelle | natürliche Killerzelle |
| nM | Nanomolar |

| | |
|-----------------------|--|
| NO | Stickstoffmonoxid |
| NSAID | Nichtsteroidale Antiphlogistika |
| nT _{reg} | natürlich vorkommende T _{reg} |
| p | Signifikanzwert |
| PanIN | Pankreatische intraepitheliale Neoplasie |
| PBMC | Peripheral blood mononuclear cells |
| PBS | Phosphate buffered saline |
| pDC | plasmazytoide DC |
| PDE | Phosphodiesterase |
| PE | Phycoerythrin |
| PE-Cy | Phycoerythrin-Cyanin |
| PerCP-Cy | Peridinin-Chlorophyll-Protein-Komplex-Cyanin |
| RNA | Ribonucleinsäure |
| RNOS | Reactive nitrogen-oxide species |
| ROS | Reactive oxygen species |
| rpm | rates per minute, Umdrehungen pro Minute |
| s.c. | subkutan |
| SE | Standardfehler |
| Sil | Sildenafil |
| SSC | side scatter |
| Tab. | Tabelle |
| T _{cm} | central memory T-Zellen |
| T _{con} | konventionelle T-Zelle |
| TCR | T-Zell-Rezeptor |
| T _{em} | effector memory T-Zellen |
| TGF- β | tumor growth factor β |
| T _H -Zelle | T-Helferzelle |
| T _{naive} | naive T-Zellen |
| TNF | Tumornekrosefaktor |
| TNM | Tumor Node Metastasis |
| T _{reg} | regulatorische T-Zelle |
| U/L | Einheiten pro Liter |
| vs. | versus, Im Vergleich zu |
| ζ | Zeta |

1. Einleitung

1.1. Das Immunsystem

Das Immunsystem ist ein komplexes Netzwerk aus Organen, Gewebe, Zellen und körpereigenen Substanzen, dessen Ziel es ist, von außen eingedrungene Keime und pathologisch veränderte Zellen des Körpers unschädlich zu machen und dadurch den Ausbruch einer Krankheit zu verhindern. Die adaptive Immunantwort entsteht während des Lebens als Anpassung des Körpers an eine Infektion mit einem Erreger. So werden dadurch z.B. Antikörper gegen ein bestimmtes Antigen eines Erregers produziert, die in den meisten Fällen lebenslang vor demselben Keim schützen. Das angeborene Immunsystem dagegen bekämpft Infektionserreger ohne vorher jemals Kontakt mit ihnen gehabt zu haben. Eindrungene Krankheitserreger werden nach Erkennung innerhalb weniger Tage durch verschiedene Abwehrmechanismen zerstört. Dazu zählen neben zellulären Bestandteilen des Immunsystems wie Granulozyten, Makrophagen und natürliche Killerzellen auch physiologische Barrieren wie Körperepithelien, die chemische Substanzen produzieren und dadurch Mikroorganismen abtöten oder deren Wachstum hemmen. Im Gegensatz zur adaptiven Immunantwort, die ausdifferenzierte Gedächtniszellen erzeugen kann, um bei einer erneuten Infektion eine schnellere und wirksamere Reaktion zu ermöglichen, entwickelt die angeborene Immunität jedoch keinen Schutz gegen eine erneute Infektion. (Janeway 2002, "Immunologie")

1.1.1. Zellen des Immunsystems

Zu den Zellen des Immunsystems gehören Granulozyten, Lymphozyten, Monozyten, dendritische Zellen, natürliche Killerzellen, Mastzellen und Makrophagen. Alle haben ihren Ursprung in den pluripotenten hämatopoetischen Stammzellen des Knochenmarks und reifen an unterschiedlichen Stellen im Körper zu funktionsfähigen Zellen heran. All diese Zellen besitzen an ihrer Oberfläche Rezeptoren, die die spezifischen Funktionen ihrer Zellen vermitteln. Anhand dieser Oberflächenproteine lassen sich die verschiedenen Zellen voneinander differenzieren. Diese phänotypische Markierung wird als Differenzierungscluster (cluster of differentiation, CD) bezeichnet. (Janeway 2002, "Immunologie")

1.1.1.1. NK- und NKT-Zellen

Natürliche Killerzellen (NK-Zellen) sind große lymphozytenähnliche, im Blut zirkulierende Zellen mit zytotoxischen Granula, die keine antigenspezifischen Rezeptoren besitzen. Dennoch sind sie in der Lage bestimmte pathologische Zellen, z.B. virusinfizierte Zellen und bestimmte Tumorzellen aufgrund fehlender oder verminderter MHC-Klasse-I-Expression zu erkennen und abzutöten. Dies geschieht durch Freisetzung ihrer lytischen Granula an der Oberfläche der gebundenen Zielzelle, wodurch dessen Zelltod ausgelöst wird. NK-Zellen produzieren eine Vielzahl von Zytokinen, Enzymen und Peptiden, die in den Granula gespeichert werden. Obwohl NK-Zellen nicht aktiviert werden müssen, bewirkt der Kontakt mit Interleukin (IL-) 12 und Interferonen wie IFN- α und IFN- β ein deutlich verstärktes Effektorpotential. NK-Zellen spielen somit eine wichtige Rolle bei der angeborenen Immunität. Etwa 5-10 % der humanen Lymphozyten lassen sich den NK-Killerzellen zuordnen. Phänotypisch werden diese durch die Expression von CD56, eine Isoform des neuronalen Zelladhäsionsmoleküls (neural cell adhesion molecule, NCAM), den Rezeptor NK1.1 und das Fehlen des CD3-Komplexes (T-Zell-Rezeptor) charakterisiert (Robertson and Ritz 1990; Lanier et al. 1991; Farag et al. 2002).

Neben den natürlichen Killerzellen gibt es noch die sogenannten natürlichen Killer-T-Zellen (NK-T-Zellen). Diese besitzen ebenfalls wie NK-Zellen den Rezeptor NK1.1, unterscheiden sich jedoch durch das Vorhandensein des CD3-Rezeptors auf deren Oberfläche und stellen somit eine Untergruppe der T-Zellen dar. NK-T-Zellen werden bei vielen Infektionen im Rahmen der frühen Immunantwort aktiviert und spielen in Zusammenhang mit Autoimmunerkrankungen eine außergewöhnliche Rolle (Kiessling et al. 1976; Janeway 2002).

1.1.1.2. Lymphozyten

Lymphozyten gehören zu den weißen Blutkörperchen (Leukozyten) des Immunsystems. Sie spielen die Hauptrolle bei der erworbenen Immunantwort und sind die wichtigsten Zellen zur Ausbildung einer lebenslangen Immunität z.B. in Folge einer Erkrankung oder einer Impfung. Aufgrund ihres Reifungsortes lassen sich T-Lymphozyten (Reifung im Thymus) von B-Lymphozyten (Reifung im Knochenmark, B für bone marrow) unterscheiden. Während die T-Zellen für die zelluläre Immunantwort verantwortlich sind, produzieren die ausgereiften B-Zellen

(Plasmazellen) Antikörpermoleküle (Immunglobuline) und induzieren somit die humorale Immunantwort. Gereifte inaktive Lymphozyten zirkulieren fortwährend zwischen Blutkreislauf, peripheren lymphatischen Organen und Lymphgefäßen hin und her, um eventuelle antigenpräsentierende Zellen (z.B. dendritische Zellen) abzufangen. Durch das Aufeinandertreffen von antigenpräsentierender Zelle und naivem T-Lymphozyt wird dessen Ausdifferenzierung zur funktionellen Effektorzelle eingeleitet. Zudem werden B-Zellen mit Hilfe von T-Zellen aktiviert und Zytokine freigesetzt, die Makrophagen anlocken und stimulieren.

Durch die Expression von Co-Rezeptoren lassen sich T-Lymphozyten weiter unterscheiden. So weisen alle T-Lymphozyten einen TCR/CD3-Komplex auf, aber nur ein Teil exprimiert CD4 und ein zweiter Teil nur CD8 (Janeway et al. 1988; Parnes 1989). Fremde Peptidantigene werden den T-Zellen über sogenannte MHC-Moleküle (major histocompatibility complex, MHC) präsentiert. Dabei lassen sich zwei Klassen von MHC-Molekülen unterscheiden: Die MHC-Klasse-I-Moleküle präsentieren an der Zelloberfläche Antigene, die aus Proteinen im Cytosol virusinfizierter Zellen stammen, während MHC-Klasse-II-Moleküle intrazelluläre Antigene präsentieren (Janeway 2002).

Ist eine Infektion beseitigt, gehen die meisten daran beteiligten Zellen durch Apoptose zugrunde. Ein kleiner Teil jedoch differenziert zu sogenannten Gedächtniszellen, die lebenslang erhalten bleiben und für die adaptive Immunantwort unerlässlich sind. Charakteristisch für humane T-Gedächtniszellen ist die Expressierung der CD45RO-Isoform des Zelloberflächenmoleküls CD45. Naive T-Zellen dagegen exprimieren die hochmolekulare Isoform von CD45, CD45RA.

Bei CD45 handelt es sich um eine Transmembran-Protein-Tyrosinphosphatase, die auf allen hämatopoetischen Zellen mit Ausnahme der Erythrozyten exprimiert wird und daher auch als "allgemeines Leukozytenantigen" (leukocyte common antigen, LCA) bezeichnet wird. So hat die CD45-Phosphatase eine große Bedeutung für die Signaltransduktion des Antigenrezeptors bei der Differenzierung und Reifung von Lymphozyten.

T-Lymphozyten sind in der Lage zu zwei unterschiedlichen Arten von Gedächtniszellen zu differenzieren. Den Effektor-Gedächtniszellen (T-effector memory cells, T_{em}) stehen die zentralen Gedächtniszellen (T-central memory cells, T_{cm}) gegenüber. Erstere verdanken ihren Namen der schnellen Umwandlung zu T-Effektorzellen, die nach erneuter Stimulation große Mengen an Interferonen und

Interleukinen sezernieren. Diese Zellen weisen im Gegensatz zu den zentralen Gedächtniszellen keinen Chemokinrezeptor CCR7 auf. Desweiteren werden diese durch das Fehlen von L-Selektin (CD62L) gekennzeichnet. Chemokinrezeptor und CD62L werden auch als sogenannte "Homing-Rezeptoren" bezeichnet, da diese für den Transport der Zellen zu deren Bestimmungsort eine essentielle Rolle spielen (Forster et al. 1999).

Zentrale Gedächtniszellen exprimieren kontinuierlich CD27 und CCR7, was dazu führt, dass sie in die T-Zellzonen von Lymphknoten einwandern und dort von weiteren professionellen antigenpräsentierenden Zellen stimuliert werden können (Sallusto et al. 2004). Zudem produzieren sie IL-2. "Central memory cells" können durch Verlust von L-Selektin zu "Effector memory cells" differenzieren (Sallusto et al. 1999; Janeway 2002). Daher sind sie für die Erhaltung des T-Zellgedächtnisses besonders wichtig, da sie durch homöostatische Proliferation Effektor Gedächtniszellen ersetzen, die durch spontanen Zelltod sterben.

1.1.1.2.1. T-Helferzellen (CD4⁺)

T-Zellen, die den Co-Rezeptor CD4 exprimieren, werden auch als sogenannte T-Helferzellen bezeichnet. Die Hauptaufgabe dieser CD4-T-Zellen besteht darin, andere Effektorzellen des Immunsystems zu aktivieren. Es lassen sich zwei funktionelle Hauptgruppen unterscheiden: T_H1-Zellen, die Interferon- γ , Lymphotoxin- α , IL-2 und tumor necrosis factor (TNF)- β sekretieren und T_H2-Zellen, die Interleukin-4 (IL-4), IL-5, IL-10 und IL-13 sezernieren (Mosmann & Sad 1996). So werden z.B.

B-Lymphozyten durch T_H2-Zellen dazu angeregt Antikörper zu produzieren, wobei hingegen T_H1-Zellen überwiegend Zytokine freisetzen, die Makrophagen anlocken und aktivieren und dadurch intrazelluläre Erreger angreifen.

Neben diesen beiden Hauptgruppen wurden in den letzten Jahren weitere Untergruppen (T_H9-Zellen, T_H17-Zellen, T_H22-Zellen und T_{FH}-Zellen) identifiziert, deren Funktionen bis heute jedoch noch nicht vollständig geklärt sind.

1.1.1.2.2. Zytotoxische T-Zellen (CD8⁺)

Zytotoxische T-Zellen, die virusinfizierte Zellen über deren MHC-I-Molekül erkennen und daran binden, exprimieren an ihrer Oberfläche als charakteristisches Merkmal das CD8-Molekül (Normant et al. 1988). Diese CD8⁺ T-Zellen haben die Aufgabe

infizierte Zellen abzutöten, indem sie in ihnen Apoptose auslösen. Dies geschieht mittels zytotoxischer Mediatoren wie z.B. Perforin, das für die Permeabilisierung der Zielzelle verantwortlich ist, und Granzymen. Diese zytotoxischen Proteasen werden aus ihren Granula freigesetzt und lösen in der Zelle eine Reihe von Enzymkaskaden aus, die zur Lysierung der Zelle führen (Squier & Cohen 1994; Barry et al. 2000; Janeway 2002).

1.1.1.3. Dendritische Zellen

Dendritische Zellen (DCs) sind die wichtigsten antigenpräsentierenden Zellen (antigen presenting cells, APC) des Immunsystems. Sie entwickeln sich aus Granulozyten-/Makrophagen-Vorläuferzellen und liegen als unreife Zellen im peripheren Gewebe vor. Ihr charakteristisches Aussehen wird von zahlreichen langen zytoplasmatischen Ausläufern bestimmt. Diese hochspezialisierten Zellen haben die Hauptaufgabe Antigene aufzunehmen und den Lymphozyten zur Erkennung zu präsentieren. Durch die Aufnahme von Antigenen im peripheren Gewebe reifen diese zu aktiven dendritischen Zellen und wandern zu den Lymphknoten, wo sie antigenspezifische zirkulierende T-Lymphozyten aktivieren. Reife dendritische Zellen exprimieren Adhäsionsmoleküle und kostimulierende Oberflächenmoleküle B7.1 (CD80) und B7.2 (CD86), die für die klonale Expansion und Differenzierung naiver T-Zellen zu Effektor-T-Zellen unerlässlich sind (Coyle AJ. & Gutierrez-Ramos JC. 2011). Dabei erfolgt die Differenzierung entweder zur T-Helferzelle (CD4⁺) oder zur zytotoxischen T-Zelle (CD8⁺).

Es werden zwei große Gruppen unterschieden, die plasmazytoiden DCs (pDCs) lymphatischen Ursprungs, die große Mengen an Zytokinen, insbesondere Interferon- α und/oder Interferon- β produzieren, und die konventionellen DCs (conventional DCs, cDCs) myeloider Herkunft (Cella et al. 1999; Siegal et al. 1999). Plasmazytoide DCs exprimieren nur wenige kostimulierende Moleküle und MHC-II-Moleküle im Vergleich zu cDCs (Asselin-Paturel et al. 2001). Aufgrund ihrer Oberflächenmoleküle können humane pDCs als CD11c^{-/low} lineage⁻ CD4⁺ CD123⁺ CD45RA⁺ HLA-DR⁺ und cDCs als CD11c^{high} CD11b^{low} charakterisiert werden (O'Keeffe et al. 2002). Murine pDCs weisen CD45R/B220⁺CD11c^{intermediate/low}CD11b⁻ auf und cDCs CD11b⁺CD11c^{high} (Banchereau & Steinman 1998; Asselin-Paturel et al. 2001; Nakano, Yanagita & Gunn 2001; Janeway 2002).

1.1.1.4. Regulatorische Zellen

Regulatorische Zellen sind für die Unterscheidung von körpereigenen und körperfremden Zellen unabdingbar. Dieses komplexe System stellt eine Art Kontrollsystem dar, das zur Aufrechterhaltung der Immuntoleranz benötigt wird, um autoimmune Geschehen im gesunden Organismus zu verhindern. Dabei kommt es zu unmittelbaren Gegenregulationen nach erfolgter Immunaktivierung. Regulatorische Zellen spielen jedoch auch in Bezug auf das Tumorgeschehen eine entscheidende Rolle. Maligne Zellen können so durch verschiedene Mechanismen vom Immunsystem toleriert werden, da zytotoxische T-Zellen, NK-Zellen und andere Immunzellen gegen Tumorantigene gehemmt werden.

1.1.1.4.1. T_{reg}

Ein weiterer Typ von Effektor-T-Zellen mit immunsuppressiver Funktion stellen die regulatorischen T-Zellen (T_{reg}) dar, die die Fähigkeit besitzen, die Differenzierung von naiven T-Zellen zu T_H1, T_H2 oder T_H17-Zellen und deren Effektorfunktionen zu unterdrücken. Diese immunsuppressive Wirkung konnte anhand zahlreicher Forschungsarbeiten an Mausmodellen belegt werden, wobei es durch neonatale Thymektomien zu schweren Autoimmunerkrankungen kam (Kojima, A. 1976; Taguchi, O. & Nishizuka Y. 1981; Taguchi, O. 1985). Natürlich vorkommende regulatorische T-Zellen gehören zu den CD4⁺ T-Zellen und stellen mit ca. 5-10% aller peripheren T-Zellpopulationen zwar eine quantitativ kleinere Gruppe dar, jedoch spielen diese für die Aufrechterhaltung der Selbstregulierung des Immunsystems eine unabdingbare Rolle, da dadurch im Organismus unerwünschte oder überschießende Immunreaktionen auf körpereigene Substanzen unterdrückt werden (Wing & Sakaguchi 2010; Rudensky, A.Y. 2011; Hsieh C.S., Lee H.M., Lio C.W. 2012).

Die eindeutigsten Marker regulatorischer T-Zellen sind CD25 und der intrazelluläre Transkriptionsfaktor FoxP3 (forkhead box P3), der CD4⁺ T-Zellen in Mäusen eindeutig als T_{reg} identifiziert, da dieser im murinen Organismus nur von diesen exprimiert wird (Sakaguchi, S. et al. 1995; Hori et al. 2003; Fontenot, J.D. et al. 2003). Im Gegensatz dazu konnte gezeigt werden, dass im humanen Organismus FoxP3 auch von aktivierten CD4⁺ Effektor-T-Zellen in einem niedrigen Signal exprimiert wird (Roncador G. et al. 2005; Morgan M.E. et al. 2005). CD25 ist ein

Bestandteil des IL-2-Rezeptors, der sich aus drei Untereinheiten (α , β und γ) zusammensetzt. Dabei stellt CD25 die α -Untereinheit dar, die durch Aktivierung der Zelle exprimiert wird. Durch Bindung von IL-2 an seinen Rezeptor auf der Oberfläche von Lymphozyten werden intrazelluläre Signalkaskaden ausgelöst, die eine Aktivierung und Proliferation von T-, B- und NK-Zellen bewirken. Aufgrund dieser Eigenschaft zählt IL-2 zu den Wachstumsfaktoren und wird heutzutage zur Behandlung des Nierenzellkarzinoms eingesetzt. CD25 und FoxP3 stellen unabdingbare Moleküle für die Funktion und Entwicklung natürlicher T_{reg} dar (Horak I. et al. 1995; Suzuki H. et al. 1999).

Neuere Studien haben gezeigt, dass ebenfalls der Oberflächenmarker CD127 in niedrigem Niveau exprimiert wird und somit kann dieser zur Identifizierung zusätzlich herangezogen werden (Liu W. et al. 2006; Seddiki N. et al. 2006; Hartigan-O'Connor, D. J. et al. 2007). CD127 stellt die IL-7 Rezeptor α -Kette (IL-7R α) des IL-7 Rezeptors dar. Die zweite Komponente dieses Rezeptors ist die gemeinsame Zytokin- γ -Kette (γ c-chain), die ubiquitär auf allen lymphatischen Zellen zu finden ist. Beide Elemente werden zur Signalübertragung über den IL-7 Rezeptor benötigt.

Neben den natürlich vorkommenden T_{reg} , die im Thymus reifen und diesen als FoxP3⁺ T_{reg} verlassen, gibt es auch die sogenannten induzierten T_{reg} (iT_{reg}), die sich unter Einwirkung von IL-10 aus naiven, konventionellen CD4⁺ FoxP3⁻ T-Zellen in der Peripherie entwickeln können (Roncarolo, M. et al. 2006) und bei einigen Tumorarten wie z.B. Melanom und Nierenzellkarzinom in erhöhter Anzahl im Blut oder im Gewebe vorliegen (Viguier, M. et al. 2004; Cesana, G.C. et al. 2006). Aufgrund der gehäuften Anreicherung von T_{reg} im Tumorgeschehen stellt dies in Bezug auf das Immunsystem eine negative Rolle dar, da dadurch die notwendige schützende Immunantwort unterdrückt wird. Dies geschieht entweder durch direkten Zell-Zellkontakt mit der Zielzelle oder durch freigesetzte Zytokine wie TGF- β und IL-10, die inhibitorische Wirkung haben (Asseman et al. 1999; Scheffold et al. 2007; Vignali et al. 2008; Shevach, E.M. 2009).

Für die Immunsuppression durch Zell-Zellkontakt stellen erhöhte Mengen an intrazellulärem cyclischem Adenosinmonophosphat (cAMP) eine Schlüsselfunktion dar. Dieses wird mittels sogenannter "gap junctions" von T_{reg} auf konventionelle T-Zellen (T_{con}) übertragen und dient somit zu deren Kontrolle (Bopp et al. 2007). Es konnte gezeigt werden, dass nicht-aktivierte murine T_{reg} und T_{con} ähnliche Mengen an intrazellulärem cAMP aufweisen, sich jedoch in Bezug auf die Expression

regulatorischer Enzyme des cAMP Metabolismus unterscheiden. So waren beide Enzymaktivitäten (Adenylylcyclase, AC und Phosphodiesterase, PDE) in T_{reg} geringer als in T_{con} . Zudem konnte durch IL-2 eine Aktivierung der Adenylylcyclase 7 festgestellt werden (Bazhin et al. 2010).

Durch Bildung von Adenosin-Nukleosiden mit Hilfe von CD39 und CD73 können T-Zellen in ihrer Funktion blockiert werden (Kobie et al. 2006; Deaglio et al. 2007; Beavis et al. 2012). Desweiteren üben T_{reg} eine Inhibierung von $CD8^+$ T-Zellen, dendritischen Zellen, natürlichen Killerzellen, NK-T-Zellen und B-Zellen aus (Azuma et al. 2003; Trzonkowski et al. 2004; Lim et al. 2005; Beyer & Schultze 2006; Chen W. 2006).

1.1.1.4.2. Myeloide Suppressorzellen

Myeloide Suppressorzellen (myeloid derived suppressor cells, MDSC) stellen eine heterogene Gruppe von Zellen dar, die sich aus Vorläuferzellen von Makrophagen, Granulozyten und dendritischen Zellen zusammensetzt und eine entscheidende Stellung in der Immunsuppression durch Tumoren einnehmen (Gabrilovich et al. 2009). Unter gesunden Bedingungen differenzieren diese aus dem Knochenmark stammenden myeloiden Vorläuferzellen rasch zu reifen Granulozyten, Makrophagen und dendritischen Zellen. In Tumorpatienten sowie bei Entzündungen und Traumata ist diese Differenzierung jedoch gestört und es entwickeln sich die myeloiden Suppressorzellen (Gabrilovich et al. 2009). Diese Gruppe von myeloiden Zellen liegt sowohl bei tumortragenden Patienten und Mäusen als auch bei Infektionen, Sepsis und Traumata in erhöhter Anzahl in lymphatischem Gewebe vor. In Mäusen werden diese Zellen phänotypisch als $Gr-1^+CD11b^+$ charakterisiert, wobei man hier noch zwei weitere Untergruppen unterscheiden kann: die granulozytären MDSC als $Ly6G^+Ly6C^{low}$ und die monozytären MDSC als $Ly6G^-Ly6C^{high}$ (Youn et al. 2008), wobei in den meisten Fällen die granulozytären MDSC in größerer Anzahl vorliegen (Youn et al. 2008). Humane MDSC werden aus heutiger Stand der Wissenschaft eingeteilt in $CD11b^+CD14^-CD33^+HLA-DR^-$ und $CD11b^+CD14^+CD33^+HLA-DR^{low}$ (Gabrilovich et al. 2009). MDSC sind besonders im Knochenmark, Milz, metastasierten Lymphknoten und Tumorstroma lokalisiert (Serafini et al. 2004; Serafini et al. 2006; Marigo et al. 2008) und unterscheiden sich auf funktioneller Ebene. Während MDSC im Tumorgewebe grundsätzlich Arginase (Arg1) und

induzierbare Stickstoffmonoxid (NO)-Synthase (iNOS) produzieren, müssen diese in MDSC aus peripheren lymphatischen Organen erst induziert werden (Serafini et al. 2006).

Auch die Produktion und Ausschüttung immunmodulierender Zytokine mit immunsuppressiver Wirkung auf T-Lymphozyten konnten durch Studien nachgewiesen werden. Einige von MDSC sezernierte Zytokine sind Interferon- γ (IFN- γ), Interleukin 1 β (IL-1 β), Interleukin 10 (IL-10), Interleukin 13 (IL-13), "transforming growth factor- β " (TGF- β) und "tumor necrosis factor- α " (TNF- α) (Chen et al. 2001; Terabe et al. 2003; Baniyash 2004; Gallina et al. 2006; Umemura et al. 2008).

Die wichtigsten Funktionen zur Immunsuppression durch MDSC stellen jedoch Arg1 und iNOS dar. Beide Enzyme konnten sowohl in murinen als auch in humanen MDSC nachgewiesen werden (Bronte et al. 2005). Welches von beiden jedoch bevorzugt produziert wird hängt von Tumortyp, genetischem Hintergrund sowie dem Krankheitsstadium ab (Marigo et al. 2008). Hinsichtlich der Untergruppen im Mausmodell konnte gezeigt werden, dass granulozytäre MDSC in hohem Maße ROS und wenig NO produzieren, wobei hingegen die monozytäre MDSC Gruppe wenig ROS und viel NO synthetisiert. Arg1 reduziert L-Arginin, sodass dieses für iNOS zur weiteren Verfügung steht. Dadurch werden Verbindungen wie "reactive oxygen species" (ROS) synthetisiert, die T-Zellen schädigen.

Desweiteren konnte in einem experimentellen Modell des Lymphoms nachgewiesen werden, dass MDSC T_{reg}-Proliferation auslösen können, indem sie als antigenpräsentierende Zellen fungieren (Serafini et al. 2008).

Auch konnte gezeigt werden, dass es durch myeloide Suppressorzellen zu einer Herunterregulierung der Expression der TCR- ζ -Kette in tumorinfiltrierenden T-Zellen und in T-Zellen aus peripherem Blut kommt (Ferrandina et al. 2006; Gruber et al. 2008). Die TCR- ζ -Kette ist ein wichtiger Bestandteil des T-Zellrezeptors und stellt somit einen essentiellen Faktor bei der Signaltransduktion und zur Vermittlung der Effektorfunktion in T- und NK-T-Zellen dar. Diese verringerte Expression bewirkt Immunsuppression im Organismus.

Auch die Proliferation und Effektorzytokinproduktion von T-Zellen wird durch MDSC supprimiert (Rodriguez & Ochoa 2008; Nagaraj et al. 2010).

In einer neuesten Studie von Goulart et al. 2012 konnten MDSC auch in peripheral Blut von gesunden und tumortragenden Hunden identifiziert werden. Dabei wurden insgesamt 45 tumortragende Hunde mit unterschiedlichsten Tumortypen wie Karzinome, Sarkome und Mastzelltumore und 18 gesunde Hunde untersucht, wobei Labrador Retriever und Golden Retriever zu den häufigsten Rassen gehörten. Als Antikörpermarker für MDSC beim Hund können CD11b, CD14 und MHCII eingesetzt werden, sodass sich daraus das phänotypische Bild $CD11b^+CD14^+MHCII^-$ für granulozytäre MDSC ergibt. Es konnte gezeigt werden, dass sowohl eine granulozytäre als auch eine monozytäre Gruppe mit funktionellen MDSC Eigenschaften existiert, wobei die granulozytäre Population das dominierende Bild ergab. Auf funktioneller Ebene konnte nachgewiesen werden, dass diese Zellen die MDSC charakteristischen Faktoren wie Arg1, iNOS2, TGF- β und IL-10 mRNA exprimieren und daher als MDSC bezeichnet werden können. Auch in dieser Studie wurden signifikant höhere Mengen an MDSC in fortgeschrittenem Tumorstadium nachgewiesen als in Frühstadien ohne Metastasierung oder gesunden Hunden (Goulart et al. 2012).

1.1.1.4.2.1. Wirkung von Sildenafil

Sildenafil ist ein Phosphodiesterase-5 Inhibitor und wird heutzutage therapeutisch zur Behandlung der erektilen Dysfunktion sowie zur Behandlung der idiopathischen pulmonal-arteriellen Hypertonie sowohl beim Menschen als auch bei Hunden eingesetzt, indem es zu einer kurzfristigen Erhöhung der intrazellulären Konzentration von cyclischem Guanosinmonophosphat (cGMP) kommt (Setter et al. 2005; Lee et al. 2005). Schon durch mehrere Studien konnte jedoch gezeigt werden, dass Sildenafil auch Auswirkungen auf die antitumorale Antwort in malignen Geschehen hat. So konnte z.B. Apoptose in chronisch lymphatischen Leukämiezellen bei Tumorpatienten ausgelöst werden (Sarfati et al. 2003). Auch Auswirkungen auf das Tumorwachstum und die Überlebensrate von ret transgenen Mäusen mit malignem Melanom konnten signifikant verbessert werden. So waren nach 45 Tagen noch 60% der mit Sildenafil behandelten Mäuse am Leben, in der Kontrollgruppe waren es lediglich 10% (Meyer et al. 2011). Durchflusszytometrisch konnte desweiteren eine reduzierte Anzahl von MDSC in von Metastasen befallenen Lymphknoten und eine erhöhte T-Zellanzahl bestimmt werden (Meyer et al. 2011).

Der Effekt von Sildenafil beruht auf der Herunterregulierung der von MDSC produzierten Faktoren Arg1 und NOS2. Dabei reichert sich intrazellulär cGMP an und durch negative Rückkopplung auf mRNA-Ebene wird iNOS in MDSC gehemmt. Dadurch kommt es zu einer Verminderung der NO-Sekretion von MDSC, was wiederum deren suppressive Wirkung auf T-Zellen eindämmt (Serafini et al. 2006). Ein weiterer Mechanismus konnte dadurch beschrieben werden, dass der suppressive Marker für MDSC IL-4R α durch Sildenafil verringert werden konnte (Serafini et al. 2006; Gallina et al. 2006). Desweiteren konnte gezeigt werden, dass Sildenafil einen positiven Einfluss auf den chemotherapeutischen Effekt von Doxorubicin beim Prostata- und Brustkrebs hat (Di et al. 2010; Das et al. 2010) und ABC-Transporter wie ABCB1 und ABCG2 in ihrer Aktivität hemmt (Shi et al. 2011). Diese spielen eine entscheidende Rolle im Zusammenhang mit der zunehmenden Resistenz gegenüber Arzneimitteln.

1.2. Das Pankreaskarzinom

Das Pankreaskarzinom ist ein besonders aggressiver Tumor mit hohem Metastasierungspotential und ausgeprägter Chemoresistenz. Bei dieser Tumorart besteht keine Hoffnung auf Heilung im fortgeschrittenen Krankheitsstadium. In den USA steht das Pankreaskarzinom an vierter Stelle der häufigsten Krebsarten, die innerhalb kurzer Zeit zum Tode führen und jedes Jahr werden ca. 44.000 Fälle diagnostiziert (Siegel R. et al. 2011). Die Überlebensrate von 5 Jahren liegt gerademal bei 5% und weniger als 10% der Patienten mit Pankreastumor sind jünger als 50 Jahre, wobei die mittlere Häufigkeit um die 72 Jahre liegt (Pandol et al. 2012). 98% des gesamten Pankreas bestehen aus dem exokrinen Gewebeanteil, der zum einen aus den Acinuszellen besteht, in denen die Verdauungsenzyme wie z.B. Lipase, Amylase und Peptidasen produziert und abgegeben werden, und zum anderen den Gangzellen, deren wesentliche Hauptaufgabe die Bicarbonatsekretion ist. Im exokrinen Teil verlaufen alle Nerven und Gefäße und neben Enzymen werden auch große Mengen an elektrolytreicher Flüssigkeit sezerniert. So wird die Darmschleimhaut durch Pufferung des Nahrungsbreis geschützt und für die Verdauungsenzyme ein optimales Milieu geschaffen (Von Engelhardt, Brevers 2005). Generell lässt sich die Bauchspeicheldrüse in der Humanmedizin in den Pankreaskopf, den Pankreaskörper und den Pankreasschwanz einteilen. Beim

Kleintier besteht das Pankreas aus einem Lobus sinister (Milzschenkel) und einem Lobus dexter (Duodenalschenkel) mit dem dazwischenliegenden Körper (König, Liebich 2002). Es gibt verschiedene Formen des Bauchspeicheldrüsenkrebses, wobei das ductale Adenokarzinom mit ca. 95% das weitaus häufigste darstellt. Zystadenokarzinome, Acinuszellkarzinome und neuroendokrine Tumoren stellen weitere bösartige Krebsformen dar. In Bezug auf die anatomische Lage zeigt der Pankreaskopf mit ca. 70% die bevorzugteste Lage des Tumors beim Menschen an. Danach folgen Pankreaskörper (ca. 15-20%) und Pankreasschwanz (5-10%) (Kelly & Benjamin 1995). Bei den Tieren stellt der Pankreaskörper die häufigste Lokalisation dar (Dahme et al. 2007). In der Veterinärmedizin kommen Tumore der Bauchspeicheldrüse eher seltener vor als beim Menschen, wobei meist ältere Hunde und Katzen betroffen sind (Bennett et al. 2001). An häufigster Stelle stehen neuroendokrine Tumore (Insulinome) und an zweiter Stelle Adenokarzinome, die eine Neigung zu früher Metastasierung und infiltrativem Wachstum haben (Lamb et al. 1995). Auch wird eine Rasseprädisposition beim Cocker Spaniel diskutiert (Kessler 2005).

1.2.1. Ätiologie und Risikofaktoren

Obwohl die Ätiologie des Pankreaskarzinoms noch weitestgehend unklar ist, konnte jedoch in mehreren Studien nachgewiesen werden, dass der Konsum von Zigaretten ein zwei- bis dreifach erhöhtes Risiko gegenüber Nichtrauchern mit sich bringt (Silvermann et al. 1994; Boyle et al. 1996; Fuchs et al. 1996). Zu weiteren Risikofaktoren, die das Auftreten von Pankreaskarzinomen begünstigen, zählen unter anderem auch Diabetes mellitus (Gullo L. 1999; Huxley et al. 2005) und der übermäßige Konsum von Alkohol. Zudem soll eine Prädisposition von Männern gegenüber Frauen vorliegen, da diese eine höhere Raucherquote aufweisen (Raimondi et al. 2007; Maisonneuve P. & Lowenfels A.B. 2010). Chronische Pankreatitiden stellen mit den größten Faktor dar an Bauchspeicheldrüsenkrebs zu erkranken, wobei dies wiederum in den meisten Fällen in Zusammenhang mit Zigarettenkonsum und Alkohol steht (Lowenfels et al. 1993). Nur ca. 5-10% der Gesamtzahl chronischer Pankreatitiden ist genetischer Herkunft. Dem exzessiven Alkoholkonsum von in der Regel 3 oder mehr Getränken pro Tag steht der moderate Konsum gegenüber, der nicht in Zusammenhang mit einem erhöhten Risiko gebracht

werden konnte (Tramacere et al. 2010). Adipositas in jungen Jahren stellt ebenfalls ein Risiko dar, an Bauchspeicheldrüsenkrebs zu erkranken (Li et al. 2009).

Morphologisch konnten anhand von klinischen und histopathologischen Studien drei verschiedene Vorläuferstadien der Veränderungen des Pankreasgewebes differenziert werden: die pankreatische intraepitheliale Neoplasie (PanIN), die muzinösen zystischen Neoplasien (MZN) und die intraduktale papilläre muzinöse Neoplasie (IPMN) (Brugge et al. 2004; Maitra et al. 2005).

Neben äußeren Einflussfaktoren geht man davon aus, dass in ca. 10% der Fälle mit Pankreaskarzinom die genetische Prädisposition eine Rolle spielt (Schenk et al. 2001; Petersen and Hruban 2003).

Das Onkogen K-ras, ein Mitglied der RAS Familie GTP-bindender Proteine, konnte in bis zu 95% der Fälle mit ductalem Adenokarzinom in mutierter Form gefunden werden (Queneau et al. 2001; Brunner et al. 2005) und stellt eines der frühesten genetisch veränderten Anzeichen von humaner PanIN dar (Moskaluk et al. 1997). Aufgrund der Aktivierung dieses Gens durch den Tyrosin-Kinase-Rezeptor wird als weiterer Schritt das Zellwachstum angeregt und der Zellzyklus eingeleitet. Diese Aktivierung bleibt durch Mutation dieses Gens stets erhalten und somit ist die Hemmung der Zellproliferation aufgehoben.

p53 und p16 sind die beiden bekanntesten mutierten Tumorsuppressorgene des Pankreas (Moskaluk et al. 1997), wobei das TP53-Suppressorgen in mehr als 50% der Fälle mit ductalem Pankreaskarzinom mutiert ist (Rozenblum et al. 1997; Sato et al. 1997). Ihre Suppressorfunktion wird dadurch ausgeübt, dass das Gen durch die Mutation inaktiviert und somit die Zellproliferation nicht aufgehalten wird (Pellegata et al. 1994). Daher zeigen Tumorzellen eine starke Resistenz gegenüber Chemotherapeutika.

1.2.2. Diagnose

Meist wird die Diagnose Pankreaskarzinom aufgrund des Fehlens spezifischer Symptome erst im fortgeschrittenen Stadium gestellt, in dem schon eine ausgeprägte subklinische Metastasierung in umliegende Gewebe stattgefunden hat, da es keine spezifischen Screeningmaßnahmen zur Früherkennung gibt. Die Symptome gleichen oft denen einer akuten oder chronischen Pankreatitis. Dazu gehören unter anderem Maldigestion und Malabsorption mit daraus resultierender Diarrhoe und stetigem

Gewichtsverlust (Von Engelhardt, Brevers 2005). Durch Verlegung des Ductus choledochus kommt es zu einem Rückstau der Galleflüssigkeit und als Folge entsteht ein sogenannter Stauungsikterus. Durch Verlegung der Ausführungsgänge des Pankreas kann eine exokrine Pankreasinsuffizienz ausgelöst werden und sekundär ein Diabetes mellitus entstehen. Weiterhin sind häufig Infiltrationen kranial ins Zwerchfell, portogen in die Leber und lymphogen in regionäre Lymphknoten, sowie Implantationsmetastasen im großen Netz und auf dem Peritoneum beobachtet worden. Letzteres kann zur Ausbildung eines starken Aszites führen (Warshaw, A. L. & C. Fernandez-del Castillo 1992; Li et al. 2004; Dahme et al. 2007).

In Bezug auf die heutigen diagnostischen Möglichkeiten liefern die Computertomographie (CT) ggf. mit Kontrastmittel, die Magnetresonanztomographie (MRT) und die endoskopisch retrograde Cholangio-Pankreatikographie (ERCP) die besten Resultate. Durch Studien konnte gezeigt werden, dass die ERCP auch beim Hund durchführbar ist (Spillmann et al. 2005a), jedoch stellt dies in der Veterinärmedizin die Ausnahme dar. Dabei wird eine Spiegelung des Ösophagus, des Magens und des Duodenums durchgeführt und anschließend mittels Kontrastmittel die ableitenden Gallenwege und das Pankreassystem dargestellt, um eventuelle Verengungen (durch Entzündungen oder Tumoren) diagnostizieren zu können. Die Computertomographie wird meist in Kombination mit den anderen Verfahren verwendet, um die Ausbreitung des Tumors zu bestimmen und den Körper auf Metastasen abzusuchen. Röntgenologisch lassen sich Tumoren des Pankreas wegen ihrer Kleinheit meist nicht nachweisen. Auch durch die transabdominale Sonographie ist in den meisten Fällen keine eindeutige Diagnose möglich. Beim Hund stellt die endosonographische Untersuchung des Pankreas via transgastrischem Zugang eine bessere Möglichkeit dar, die Bauchspeicheldrüse zu beurteilen, da keine Interferenz mit Gas oder Fett vorhanden ist (Morita et al. 1998).

Daneben gibt es noch Tumormarker, die ein Hinweis auf eine Tumorerkrankung zulassen. Beim Pankreaskarzinom wird der Marker CA 19-9, der im Blut nachgewiesen wird, am häufigsten verwendet. Das Problem der Marker besteht jedoch darin, dass diese nicht sensitiv genug sind. Daher wird dieser eher postoperativ zur Verlaufskontrolle bei der Nachsorgeuntersuchung eingesetzt.

1.2.3. Staging und Prognose

Für das Staging des Tumors und somit für die Beurteilung über dessen Operabilität sind die Computertomographie, die ERCP und die Magnetresonanztomographie heutzutage unerlässlich. Vor Therapiebeginn muss das Tumorstadium ermittelt werden, um die am besten geeignete Therapiemethode wählen zu können. Die verschiedenen Stadien lassen sich anhand der TNM-Klassifikation einteilen. Dabei bezeichnet T die Größe und Ausdehnung des Primärtumors, N die Anzahl der befallenen Lymphknoten und M das Auftreten und die Lokalisation von Fernmetastasen.

| STADIUM UICC 2010 | TNM-System | | |
|-------------------|------------|---------|----|
| Stadium 0 | Tis | N0 | M0 |
| Stadium IA | T1 | N0 | M0 |
| Stadium IB | T2 | N0 | M0 |
| Stadium IIA | T3 | N0 | M0 |
| Stadium IIB | T1-T3 | N1 | M0 |
| Stadium III | T4 | jedes N | M0 |
| Stadium IV | jedes T | jedes N | M1 |

Abb. 1.2.3.1. Einteilung der Stadien des Pankreaskarzinoms anhand der TNM-Klassifikation

Quelle: <http://www.uniklinik-ulm.de/struktur/zentren/cccu/home/fuer-patienten-und-angehoerige/krebsbehandlung/krebs-spezifisch/pankreaskarzinom.html>

Meist wird die Diagnose erst im fortgeschrittenen Stadium (Stadium IV) gestellt, in dem schon Fernmetastasen vorhanden sind, sodass die Prognose eher schlecht ist. Nur bei ca. 15-20 % der Patienten kommt zu dem Zeitpunkt der Diagnosestellung eine chirurgische Therapiemöglichkeit in Betracht (Almhanna K. & Philip P.A. 2011). Desweiteren ist es zur Beurteilung der Prognose nach einer Operation von entscheidender Bedeutung, ob der Tumor vollständig entfernt werden konnte (RO= kein Residualtumor nach OP). Aufgrund der schlechten Prognose ist es daher zwingend notwendig neue Verfahren zur Diagnostizierung von Anfangsstadien zu entwickeln und neue Therapieansätze zu erforschen.

1.3. Therapie des Pankreaskarzinoms

Die Therapiemöglichkeiten sind für das Pankreaskarzinom sehr begrenzt und im Allgemeinen gilt, dass eine Erkennung im Frühstadium bessere Optionen bietet. Aufgrund der meist sehr späten Diagnose ist nur in äußerst seltenen Fällen eine heilende Therapie möglich. Diese Erkenntnis fordert für die Behandlung beim fortgeschrittenen Karzinom die Entwicklung neuer Therapiestrategien. Als derzeitige Therapiemöglichkeiten stehen die chirurgische Operation, die Strahlentherapie, die Chemotherapie sowie andere palliative Therapieansätze zur Verfügung.

1.3.1. Chirurgische Therapie

Nur bei ca. 15-20 % der Patienten besteht zu dem Zeitpunkt der Diagnosestellung eine chirurgische Therapiemöglichkeit mit geringen Chancen auf Heilung (Almhanna K. & Philip P.A. 2011), für die restlichen Patienten besteht nur die Möglichkeit einer palliativen Behandlung. Eine geringe Chance auf Heilung ist jedoch nur durch eine radikale Entfernung des Tumors gegeben, wobei trotzdem bei der Mehrzahl der Patienten nach kompletter Resektion Lokalrezidive und Fernmetastasen auftreten und somit liegt die Überlebensrate von 5 Jahren auch hier nur bei ca. 17-25% (Allema et al. 1995; Sohn et al. 2000; Yeo et al. 2002).

Die klassische Variante der Operation des Bauchspeicheldrüsenkopfkrebsses stellt die Pankreaskopfresektion nach Kausch/Whipple dar. Dabei werden der Pankreaskopf, die distale Hälfte des Magens, das Duodenum, die Gallenblase und die umliegenden Lymphknoten entfernt. Nur somit können die wichtigsten Abflusswege des Tumors beseitigt werden. Anschließend kann eine histopathologische Untersuchung der Lymphknoten zur Beurteilung der Ausbreitung des Tumors erfolgen. Heutzutage wird die klassische Variante jedoch meist in abgewandelter Form ausgeübt, bei der der Magen nicht mit reseziert wird und der Schließmuskel am Magenausgang erhalten bleibt. Diese Operation nennt man pyloruserhaltende Operation oder Operation nach Traverso/Longmire.

Die totale Pankreatektomie, bei der die gesamte Bauchspeicheldrüse entfernt wird, stellt aufgrund der schwerwiegenden postoperativen Komplikationen wie der äußerst schweren Einstellung des Zuckerstoffwechsels mit Gefahr der Hypoglykämie nur das letzte Mittel der Wahl dar. In der Veterinärmedizin werden diese Verfahren jedoch aufgrund der hohen Komplikationsrate nur in sehr wenigen Ausnahmefällen durchgeführt.

1.3.2. Chemotherapie

Die Chemotherapie hat einen sehr großen Stellenwert in der Therapie des Pankreaskarzinoms. Sie kann zum einen vor einer Operation zur Verkleinerung des Tumors (neoadjuvant) dienen, als auch zusätzlich postoperativ (adjuvant) zur weitergehenden Behandlung, um das Risiko von Rezidiven einzudämmen. Für einen nicht operablen Tumor stellt sie das palliative Mittel der Wahl dar. Eine Chance auf Heilung besteht jedoch mit dieser Therapiemaßnahme nicht, es wird lediglich versucht, das Tumorstadium zu bremsen bzw. tumorbedingte Beschwerden zu lindern. Daher sollte bei einem resezierbaren Tumor immer die chirurgische Option in Betracht gezogen werden.

Das seit November 1995 zugelassene Zytostatikum Gemcitabin (Gem) ist das heutige Standardchemotherapeutikum beim fortgeschrittenen Bauchspeicheldrüsenkarzinom, das bisher die größte palliative Wirksamkeit zeigte. Das lange Zeit zuvor eingesetzte 5-Fluorouracil (5-FU) rückte aufgrund der Ergebnisse einer Studie von Burris & Storniolo 1997, in der Gem diesem überlegen war, in den Hintergrund. Dies konnte jedoch erst kürzlich durch die ESPAC-3 Studie (2000-2009), einer der größten adjuvanten Studien bisher in Bezug auf Bauchspeicheldrüsenkrebs mit 1088 Patienten aus 17 verschiedenen Ländern, widerlegt werden. Dabei wurde nach Resektion des Tumors die Behandlung mit 5-FU und Folinsäure mit Gem verglichen. Die Ergebnisse brachten keine signifikanten Unterschiede. So betrug die mittlere Überlebenszeit unter Einsatz von 5-FU und Folinsäure 23,0 Monate im Gegensatz zur Gem-Therapie mit 23,6 Monaten. Auch die mittlere progressionsfreie Überlebenszeit zeigte mit 14,1 Monaten (5-FU + Folinsäure) und 14,3 Monaten (Gem) keine Unterschiede (Neoptolemus et al. 2010). Anzumerken sei, dass der Dosierungsplan von 5-Fluorouracil ohne Folinsäure in der Studie von Burris & Storniolo deutlich weniger invasiv war.

Gem ist ein Pyrimidinanalog, das intrazellulär durch Nukleosidkinasen zu dem pharmakologisch aktiven Diphosphat-Nukleosid (dFdCDP) und Triphosphat-Nukleosid (dFdCTP) metabolisiert wird. Beide Metaboliten haben ihre Wirkung an der DNA-Synthese, in dem nach Einbau in die DNA Apoptose eingeleitet wird.

Neben der Gem-Monotherapie existieren weitere Studien über Gemcitabin-basierte Kombinationstherapien, die unterschiedliche Ergebnisse in Bezug auf die Überlebensrate zeigten und bis heute keine eindeutigen Vorteile brachten (Riess et al. 2005; Herrmann et al. 2007). Zudem wurden Nebenwirkungen der

Kombinationstherapie wie Neutropenie, Thrombozytopenie und Erbrechen signifikant häufiger beobachtet.

Eine neueste Studie von 2011 vergleicht das FOLFIRINOX-Schema, eine Vierfachkombination bestehend aus 5-FU, Folinsäure, Irinotecan und Oxaliplatin, mit dem derzeitigen Standardtherapeutikum Gem. Dabei zeigten FOLFIRINOX-Patienten ein deutlich längeres progressionsfreies Überleben als Patienten, die mit Gem behandelt wurden (6,4 Monate vs. 3,4 Monate). Auch die Ergebnisse auf das Gesamtüberleben waren signifikant erhöht (11,1 Monate vs. 6,8 Monate) (Conroy et al. 2011). FOLFIRINOX könnte sich somit zum neuen Ersttherapeutikum für Patienten mit metastasiertem Pankreaskarzinom und gutem Allgemeinbefinden entwickeln und dadurch das jahrelang standardmäßig verwendete Gem in Zukunft ablösen. Um dies zu klären werden jedoch weitere Studien notwendig sein.

1.3.3. Strahlentherapie

Der Einsatz von Strahlentherapie alleine brachte bezüglich der Erhöhung der medianen Überlebenszeit keine signifikanten Ergebnisse (Krempien et al. 2004). Somit stellt die neoadjuvante Strahlentherapie (meist kombiniert mit Chemotherapie) nur eine Kombinationsmöglichkeit zur Operation dar, bei der die lokal fortgeschrittenen Tumore präoperativ derartig verkleinert werden können, sodass eine sekundäre Resektion möglich ist.

Zudem wird die Strahlentherapie zur Schmerzlinderung eingesetzt (palliative Therapie).

1.3.4. Immuntherapie

Tumorzellen können sich durch verschiedene Mechanismen dem Immunsystem entziehen. Dies geschieht entweder durch fehlende Antigenpräsentation an deren Oberfläche oder auch durch Sekretion inhibitorischer Zytokine wie IL-10 oder IL-3. Durch das Fehlen der Antigene auf deren Oberfläche werden Tumorzellen nicht von den Zellen des Immunsystems erkannt und können somit nicht vernichtet werden. Durch diese Fähigkeit können Tumorzellen im menschlichen Organismus überleben.

Es gibt zum einen die Möglichkeit das Immunsystem aktiv durch bestimmte Substanzen zu stimulieren. Dazu zählen z.B. Interferon- α beim Pankreaskarzinom oder IL-2 beim malignen Melanom.

Zum anderen konnte gezeigt werden, dass genmodifizierte Tumorzellen, die den Patienten implantiert wurden, das immunstimulierende Protein GM-CSF (granulocyte macrophage colony-stimulating factor) produzieren, das wiederum T-Zellen aktiviert. Diese Methode konnte z.B. beim Nierenzellkarzinom erfolgreich eingesetzt werden (Elizabeth M. Jaffee, 1999).

1.4. Ziele der vorliegenden Arbeit

Die vorliegende Arbeit verfolgte das Ziel, die Kombination der Neutralisierung immunsuppressorischer Wirkungen von MDSC (mittels Sildenafil) und Chemotherapie (mittels Gem) als neuartigen therapeutischen Ansatz zur Behandlung des Pankreaskarzinoms in einem orthotopen Mausmodell zu entwickeln. Durch Suppression der MDSC-Aktivität wollen wir die antitumoralen T-Zell-Immunantworten stimulieren und somit therapeutische Wirkungen erreichen. Durch Entwicklung verbesserter Behandlungsstrategien eröffnen sich neue Wege für die Behandlung des humanen Pankreaskarzinoms.

Hierfür wurden folgende Untersuchungen durchgeführt:

1. Untersuchung des Einflusses von Sildenafil auf das Überleben, das Tumorwachstum und die Metastasierungsrate
2. Durchflusszytometrische Charakterisierung der Immunzellen gesunder und tumortragender Mäuse nach Sildenafilgabe
3. Durchflusszytometrische Charakterisierung der Leukozyten nach Kultivierung ex vivo mit und ohne Sildenafil
4. Untersuchung des Einflusses einer Kombinationstherapie (Sildenafil + Gem) auf Tumor und immunologische Parameter

2. Material und Methoden

2.1. Material

2.1.1. Mäuse

| <i>Mäuse</i> | <i>Bezugsquelle</i> |
|---------------------|----------------------------|
| C57BL/6 | Charles River, Sulzbach |

Tab. 2.1.1.1. Mäuse

2.1.2. Pankreaskarzinomzellen

| <i>Linie</i> |
|---------------------|
| PanC02 |

Tab. 2.1.2.1. Pankreaskarzinomzellen

2.1.3. Anästhetika

| <i>Anästhetikum</i> | <i>Hersteller</i> |
|------------------------------|--------------------------|
| Isofluran Baxter (Isofluran) | Baxter GmbH |

Tab. 2.1.3.1. Anästhetika

2.1.4. Nichtsteroidale Antiphlogistika

| <i>NSAID</i> | <i>Hersteller</i> |
|--|--------------------------|
| Rimadyl® ad us. vet., Injektionslösung (Carprofen) | Pfizer AG |

Tab. 2.1.4.1. Nichtsteroidale Antiphlogistika

2.1.5. Antikörper für die Durchflusszytometrie ("anti-mouse")

| <i>Spezifität</i> | <i>Konjugat</i> | <i>Klon</i> | <i>Isotype</i> | <i>Menge pro 2x10⁶ Zellen/50µl</i> | <i>Hersteller</i> |
|--------------------------|------------------------|--------------------|---|--|--------------------------|
| CD62L | APC | MEL-14 | Rat (Fischer) IgG _{2a} , κ | 1µl | BD Pharmingen |
| CD25 | APC | PC61 | Rat (Outbred OFA) IgG ₁ , λ | 1.5µl | BD Pharmingen |
| CD11c | APC | HL3 | Armenian Hamster IgG1, λ2 | 1µl | BD Pharmingen |

| | | | | | |
|------------------|--------------|-----------|--|--------|---------------|
| CD115 | APC | AFS98 | Rat IgG2a, κ | 1μl | eBioscience |
| Gr-1 | APC-Cy 7 | RB6-8C5 | Rat IgG _{2b} , κ | 0.25μl | BD Pharmingen |
| CD3e | APC-Cy 7 | 145-2C11 | Armenian Hamster IgG1, κ | 2μl | BD Pharmingen |
| CD44 | FITC | IM7 | Rat IgG _{2b} , κ | 0.5μl | BD Pharmingen |
| FoxP3 | FITC | FJK-16s | Rat IgG _{2a} , κ | 1μl | eBioscience |
| CD80 | FITC | 16-10A1 | Armenian Hamster IgG2, κ | 1μl | BD Pharmingen |
| F4/80 | FITC | BM8 | Rat IgG2a, κ | 1μl | eBioscience |
| CD45R/B220 | Pacific Blue | RA3-6B2 | Rat IgG _{2a} , κ | 1μl | BD Pharmingen |
| CD45RB | PE | 16A | Rat IgG _{2a} , κ | 1μl | BD Pharmingen |
| NK-1.1 | PE | PK136 | Mouse (C3H x BALB/c) IgG _{2a} , κ | 1μl | BD Pharmingen |
| I-A ^b | PE | AF6-120.1 | Mouse (BALB/c) IgG _{2a} , κ | 0.5μl | BD Pharmingen |
| Ly-6G | PE | 1A8 | Rat (LEW/N) IgG _{2a} , κ | 0.5μl | BD Pharmingen |
| CD86 | PE-Cy 7 | GL1 | Rat (Louvain) IgG _{2a} , κ | 1μl | BD Pharmingen |
| CD8a | PerCP-Cy 5.5 | 53-6.7 | Rat (LOU/Ws1/M) IgG _{2a} , κ | 1μl | BD Pharmingen |
| CD69 | PerCP-Cy 5.5 | H1.2F3 | Armenian Hamster IgG1, λ3 | 1.5μl | BD Pharmingen |
| CD11b | PerCP-Cy 5.5 | M1/70 | Rat (DA) IgG _{2b} , κ | 1μl | BD Pharmingen |
| CD4 | V450 | RM4-5 | Rat (DA) IgG _{2a} , κ | 1μl | BD Horizon |
| Ly-6C | V450 | AL-21 | Rat IgM, κ | 0.1μl | BD Horizon |
| CD3e | V500 | 500A2 | Syrian Hamster IgG2, κ | 1.5μl | BD Horizon |
| CD45 | V500 | 30-F11 | Rat (LOU/Ws1/M) IgG _{2b} , κ | 2μl | BD Horizon |
| CD16/CD32 | ohne | 93 | Rat IgG2a, λ | 2μl | eBioscience |

Tab. 2.1.5.1. Antikörper für die Durchflusszytometrie ("anti-mouse")

2.1.6. Antikörper für die Durchflusszytometrie ("anti-human")

| Spezifität | Konjugat | Klon | Isotype | Menge pro 1x10⁶ Zellen/50μl | Hersteller |
|-------------------|-----------------|-------------|------------------------------|---|-------------------|
| CD68 | Alexa Fluor®647 | Y1/82A | Mouse IIgG _{2b} , κ | 4μl | BD Pharmingen |

| | | | | | |
|----------------------------|--------------|--------------|-----------------------------|-------|-----------------|
| CD45 | AmCyan | 2D1 | Mouse IgG ₁ , κ | 2μl | BD Biosciences |
| CD69 | APC | FN50 | Mouse IgG ₁ , κ | 1μl | BD Pharmingen |
| CD25 | APC | M-A251 | Mouse IgG ₁ , κ | 5μl | BD Pharmingen |
| CD73 | APC | AD2 | Mouse IgG ₁ , κ | 5μl | BD Pharmingen |
| HLA-DR | APC-Cy7 | L243 (G46-6) | Mouse IgG ₁ , κ | 1μl | BD Biosciences |
| CD4 | APC-H7 | SK3 | Mouse IgG ₁ , κ | 2.5μl | BD Biosciences |
| CD26 | Biotin | M-A261 | Mouse IgG ₁ | 10μl | eBioscience |
| CD62L | FITC | Dreg 56 | Mouse IgG ₁ , κ | 1μl | BD Pharmingen |
| FoxP3 | FITC | PCH101 | Rat IgG _{2a} , κ | 5μl | eBioscience |
| CD11b | FITC | ICRF 44 | Mouse IgG ₁ , κ | 2.5μl | eBioscience |
| CD123 | FITC | 7G3 | Mouse IgG _{2a} , κ | 5μl | BD Pharmingen |
| CD3 | Pacific Blue | UCHT1 | Mouse IgG ₁ , κ | 5μl | BD Pharmingen |
| CD14 | Pacific Blue | M5E2 | Mouse IgG ₁ , κ | 5μl | BD Pharmingen |
| CD39 | PE | TÜ66 | Mouse IgG _{2b} , κ | 15μl | BD Pharmingen |
| CD86 | PE | 2331 (FUN-1) | Mouse IgG ₁ , κ | 5μl | BD Pharmingen |
| CD11c | PE-Cy 5 | B-ly6 | Mouse IgG ₁ , κ | 10μl | BD Pharmingen |
| CD73 | PE-Cy7 | AD2 | Mouse IgG ₁ , κ | 5μl | BD Pharmingen |
| CD33 | PE-Cy7 | P67.6 | Mouse IgG ₁ , κ | 1μl | BD Biosciences |
| CD80 | PE-Cy7 | L307.4 | Mouse IgG ₁ , κ | 5μl | BD Pharmingen |
| CD45RO | PerCP-Cy 5.5 | UCHL1 | Mouse IgG ₁ , κ | 1μl | BD Pharmingen |
| CD8 | V 500 | RPA-T8 | Mouse IgG ₁ , κ | 3μl | BD Horizon |
| CD127 | V450 | hIL-7R-M21 | Mouse IgG ₁ , κ | 2.5μl | BD Horizon |
| CD3 | V500 | UCHT1 | Mouse IgG ₁ , κ | 3μl | BD Horizon |
| CD19 | V500 | HIB19 | Mouse IgG ₁ , κ | 3μl | BD Horizon |
| FcR Blocking Reagent human | ohne | - | - | 10μl | Miltenyi Biotec |

Tab. 2.1.6.1. Antikörper für die Durchflusszytometrie ("anti-human")

2.1.7. Streptavidin für die Durchflusszytometrie

| <i>Konjugat</i> | <i>Menge pro 1×10^6 Zellen/50µl</i> | <i>Hersteller</i> |
|------------------------|--|--------------------------|
| PerCP-Cy 5.5 | 1.25µl | eBioscience |

Tab. 2.1.7.1. Streptavidin für die Durchflusszytometrie**2.1.8. Laborgeräte**

| <i>Gerät</i> | <i>Hersteller</i> |
|---|--------------------------|
| Bio Vortex V1 | Lab-4 you |
| Digital Timer | neoLab |
| Dispensette® | Brand |
| Durchflusszytometer (FACS) Canto II | Becton Dickinson |
| GASTIGHT Syringe 25µl | Hamilton Company |
| Gefrierschrank -20 °C | Liebherr |
| Inkubator HeraCell | Heraeus |
| Kühlschrank 4 °C | Liebherr |
| Lichtmikroskop Axiostar _{plus} | Zeiss |
| Lichtmikroskop Axiovert 25 | Zeiss |
| Multipette® plus | Eppendorf |
| Pipette Proline | Biohit GmbH |
| Pipetten Pipetman | Gilson |
| Pipetus®-akku | Hirschmann Laborgeräte |
| Sterilbank HeraSafe | Heraeus |
| Vortex Genie 2 | Scientific Industries |
| Waage EW600-2M | Kern & Sohn GmbH |
| Zählkammer Neubauer Improved | neoLab Laborbedarf GmbH |
| Zentrifuge 5810 R | Eppendorf |

Tab. 2.1.8.1. Laborgeräte

2.1.9. Verbrauchsmaterialien

| <i>Verbrauchsmaterialien</i> | <i>Hersteller</i> |
|---|-------------------------------|
| Aluminiumfolie | Roth GmbH |
| Combitips Plus (0.1ml, 0.5ml, 2.5ml, 5ml) | Eppendorf |
| Costar® Stripette (5ml, 10ml, 25ml) | Corning Incorporated |
| Eppendorf Tubes 1,5ml | Eppendorf |
| Millex Sterilfilter 33mm Durchmesser | Millipore |
| Polysorb™ USP 5-0 | Covidien AG |
| Probenröhrchen für FACS 5ml | Becton Dickinson |
| Reagenzröhrchen Falcon (50ml, 15ml) | Becton Dickinson |
| Spritzen 50ml | B.Braun |
| Spritzen 5ml | Becton Dickinson |
| Transferpipetten 3ml | Becton Dickinson |
| Wundklammergerät Reflex 7mm | Roboz Surgical Instrument Co. |
| Wundklammern Reflex 7mm | Roboz Surgical Instrument Co. |
| Mikrotiterplatten (6-well, 96-well) | Becton Dickinson |
| Zellschaber 25cm | Sarstedt |
| Zellsiebe (100µm, 40µm) | Becton Dickinson |

Tab. 2.1.9.1. Verbrauchsmaterialien**2.1.10. Chemikalien**

| <i>Chemikalien</i> | <i>Hersteller</i> |
|---|---------------------------------|
| Biocoll Separating Solution | Biochrom AG |
| Dulbecco's PBS Solution (10x) | PAA Laboratories GmbH |
| EDTA 0.5M; pH 8.0 | SERVA Electrophoresis GmbH |
| FoxP3 Staining Buffer Set | eBioscience |
| Gemcitabin Kabi 38mg/ml Pulver zur Herstellung einer Infusionslösung (Gemcitabin) | Fresenius Kabi Deutschland GmbH |
| Revatio® 20mg (Sildenafil) | Pfizer Deutschland GmbH |
| RPMI 1640 | PAA Laboratories GmbH |
| Sildenafil citrate salt 20mg/ml | Sigma Aldrich |
| Tryptanblaulösung 0.5% | Biochrom AG |

Tab. 2.1.10.1. Chemikalien

2.1.11. Lösungen

2.1.11.1. Puffer für die Durchflusszytometrie

Erythrozyten-Lysepuffer:

- 8.29 g NH_4Cl , 1 g KHCO_3 , 0.037 g EDTA, in 100ml H_2O , autoklaviert

FACS-Puffer (human):

- PBS-Lösung (10-fach verdünnt) + 1ml EDTA + 12,5ml Humanes Serum
Albumin 20%

Stain-Puffer (mouse):

- PBS-Lösung (10-fach verdünnt) + 1ml EDTA + 5ml Mouse Serum (inaktiviert)

Fixierlösung für intrazelluläre FACS-Färbung:

- 1:4 Verdünnung Fixation/Permeabilization Concentrate (eBioscience) +
Fixation/Permeabilization Diluent (eBioscience)

Waschlösung für intrazelluläre FACS-Färbung ("Perm-Wash"):

- 1:10 Verdünnung Permeabilization Buffer (eBioscience) + destilliertes H_2O

2.1.11.2. Medien und Lösungen für die Zellkultur

Waschmedium für die Zellkultur:

- PBS-Lösung (10-fach verdünnt), steril
- PBS-Lösung (10-fach verdünnt) + 1ml EDTA, steril

Zellkulturmedium für PBMC-Kultur:

- RPMI 1640 + Fetal Calf Serum 10% (hitzeinaktiviert bei 56°C für 30min) +
Penicillin 10^5 U/L + Streptomycin 10^5 µg/L

Sildenafil Stammlösung

- Sildenafil citrate salt 20mg/ml in 1ml PBS (steril) auflösen
- Die Konzentration der Stammlösung beträgt 7.5 mM

1. Verdünnung 1:10 der Sil Stammlösung

- 10µl Sil Stammlösung + 90µl PBS

2. Verdünnung

- 10µl von 1. Verdünnung + 90µl PBS

2.1.12. Software

| Software | Hersteller |
|----------------------------|-------------------|
| Flowjo (Version 7.6.1) | Tree Star |
| GraphPad PRISM (Version 5) | GraphPad Software |

Tab. 2.1.12.1. Software

2.2. Methoden

2.2.1. Das orthotope Mausmodell

Für die orthotope Implantation von Pankreaskarzinomzellen der syngen Line Panc02 wurden die Mäuse durch Inhalationsnarkose mittels eines Inhalationsnarkosegerätes anästhesiert. Zur Inhalationsnarkoseeinleitung wurden 5% Isofluran®/O₂ und zur Narkoseerhaltung 2% Isofluran®/O₂ eingesetzt. Direkt nach der Narkoseeinleitung wurde 50µl Rimadyl® (1:10 verdünnt mit 0,9% NaCl, 5mg/kg KG, s.c.) zur Schmerzausschaltung verabreicht.

Mit Erreichen des chirurgischen Toleranzstadiums III₂ wurden die Mäuse anschließend für die Laparotomie in Rückenlage fixiert und das Abdomen nach substernaler und abdomineller Rasur und Desinfektion mit Alkohol durch einen Schnitt in der Linea alba eröffnet. Nach Vorverlagerung des Pankreas wurden 5x10⁴ Panc02 Zellen (gelöst in 0,9% NaCl) in 5µl Volumen mittels einer GASTIGHT Syringe (25µl) direkt in den Kopf des Pankreas injiziert. Danach wurde die Injektionsstelle mit Hilfe einer Pinzette durch 30-sekundiges Abklemmen verschlossen.

Anschließend erfolgte nach vorsichtiger Rückverlagerung des Pankreasgewebes in das Abdomen der 2-schichtige Wundverschluss mittels einfacher fortlaufender Naht (Kürschnernaht). Bei beiden Schichten wurde ein resorbierbarer polyfiler Faden (Polysorb™ 5-0, Rundnadel 12mm) verwendet und der Hautschnitt zusätzlich mit Metallwundklammern verschlossen. Die Klammern wurden nach 7-10 Tagen entfernt.

2.2.1.1. Behandlung mit Sildenafil und Gemcitabin

Die Mäuse wurden ab dem 5. Tag post-op über das Trinkwasser mit Sildenafil behandelt. Dabei wurde eine 20mg-Tablette in 200ml Wasser aufgelöst und den Tieren als Tränkwasser verabreicht. Dies entspricht bei einer durchschnittlichen Wasseraufnahme von 4ml/Maus/Tag einer Konzentration von 20mg/kg Körpergewicht/Tag. Das mit Sildenafil angereicherte Trinkwasser wurde alle 48 Stunden neu angesetzt.

Für die Kombinationstherapie mit Gem wurde den Mäusen das Chemotherapeutikum an Tag 5, 9, 12 und 16 in einem Volumen von 200µl Arbeitslösung pro 20g Maus i.p. injiziert. Dies entspricht einer Dosierung von 15mg/kg Körpergewicht. Zur Herstellung der Arbeitslösung wurde zunächst eine 1:2,53 Verdünnung der Stammlösung angefertigt. Diese wurde anschließend durch eine weitere Verdünnung (1:10) zur fertigen Arbeitslösung verarbeitet. Bei beiden Verdünnungen wurde 0,9% NaCl verwendet.

Alle Tiere erhielten Futter ad libitum und wurden unter tierschutzgerechten Bedingungen gehalten. Die Temperatur im Tierraum lag zwischen 20 °C und 24 °C und die Luftfeuchte betrug zwischen 45% und 65%.

Zur phänotypischen Charakterisierung von Leukozyten in gesunden und tumortragenden Mäusen erfolgte die Tötung der Mäuse mittels cervikaler Dislokation an Tag 20 post-op.

Die Beurteilung der Effekte der Behandlung auf das Überleben der Tiere erfolgte entweder durch Eintreten des natürlichen Todes oder durch vorzeitige Tötung aus tierschutzrelevanten Aspekten.

2.2.2. Präparation von Tumorgewebe und lymphatischer Organe

An Tag 20 post-op erfolgte die Tötung mittels cervikaler Dislokation. Anschließend wurden Milz und Tumorgewebe freipräpariert, das Gewicht mit einer geeichten Präzisionswaage analysiert und das Tumolvolumen mittels eines Messschiebers gemessen. Gleichzeitig wurde auf das Vorhandensein von Leber-, Lungen-, Bauchfell- und Mesenterialmetastasen untersucht.

2.2.3. Herstellung von Einzelzellsuspensionen

Nach der Entnahme von Milz und Tumorgewebe wurden diese zur Zellgewinnung über einem Zellsieb (100µm) zerrieben, anschließend mit 10ml PBS gespült und für 5 min bei 4°C und 1200 rpm abzentrifugiert. Nach Verwerfen des Überstandes wurden die Proben mit Erythrozyten-Lysepuffer versetzt, resuspendiert und für 4 min bei Raumtemperatur inkubiert. Dadurch kommt es zu einer Zerstörung der Erythrozyten und somit wird eine unspezifische Antikörperbindung an diese verhindert. Nach anschließendem Waschen der Zellen (20ml PBS, 5 min, 4°C, 1200 rpm) wurden diese nochmals durch ein kleinporigeres Zellsieb (40µm) gefiltert und im Anschluss für 5 min bei 4°C und 1200 rpm abzentrifugiert. Danach wurde unter Verwendung von Trypanblau und Neubauer-Zählkammer die Zellzahl bestimmt (Milz) und abschließend die vorhandene Konzentration der Zellsuspension an die gewünschte Endkonzentration von 2×10^6 Zellen pro 50µl angeglichen. Die Proben des Tumorgewebes wurden mit 50µl Stain-Puffer pro 100mg Tumorgewicht versetzt.

2.2.4. Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie, auch FACS ("Fluorescence activated cell sorting") genannt, ist eine Methode der Zellanalyse, mit Hilfe derer Zellen aufgrund ihrer charakteristischen Eigenschaften wie relative Größe (Forward Scatter, FSC), relative Granularität (Side Scatter, SSC) und relative Fluoreszenzintensität bestimmt werden können. Grundlage hierfür bildet die Antigen-Antikörperreaktion, indem fluoreszenzgekoppelte Antikörper spezifisch an die Zellen binden. Da es bei der Verwendung von fluoreszenzgekoppelten Antikörpern zu einer Überlappung der Fluoreszenzspektren kommen kann, wurde vor der Messung eine Kompensation durchgeführt. Dabei wurden einzeln gefärbte Proben der jeweiligen Antikörper im FACS separat gemessen.

Die Untersuchung der Immunzellen erfolgte hinsichtlich ihrer Lymphozyten-T-Zell-Subpopulation (CD4, CD8), regulatorischer T-Zellen (CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺), naiver T-Zellen (CD62L⁺CD45RB⁺), central memory T-Zellen (CD62L⁺CD45RB⁻), effector memory T-Zellen (CD62L⁻CD45RB⁻), dem Anteil von NK-Zellen (CD3⁻NK1.1⁺) und NK-T-Zellen (CD3⁺NK1.1⁺), myeloider Suppressorzellen und deren Subpopulationen (Gr-1⁺CD11b⁺, Ly-6G, Ly-6C) und dendritischer Zellen (CD11b, CD11c, CD45R/B220, CD80/CD86).

2.2.4.1. Extrazelluläre FACS-Färbung

Für die extrazelluläre FACS-Färbung mit fluoreszenzgekoppelten Antikörpern wurden zunächst je 50µl der Einzelzellsuspensionen in Mikrotiterplatten (96-well) vorgelegt. Dann erfolgte die Zugabe von je 2µl CD16/CD32 Fc-Receptor Block, um unspezifische Hintergrundfärbung über die Fc-Rezeptoren zu vermeiden. Nach Zufügen des Antikörpers wurden die Zellen für 10 min bei 4°C im Kühlschrank inkubiert. Anschließend wurden die jeweiligen fluoreszenzgekoppelten Antikörper in den jeweiligen spezifischen Mengen den einzelnen Zellsuspensionen zugesetzt, gut durchgemischt und dann für weitere 10-20 min bei 4°C im Dunkeln inkubiert. Nach dem Einwirken wurden die Zellen noch 2x mit je 200µl Stain-Puffer gewaschen (4°C, 1500 rpm, 5 min), der Überstand verworfen und die Zellen in 300µl Stain-Puffer resuspendiert. Diese wurden sodann in die jeweiligen FACS-Röhrchen übergeführt und im Durchflusszytometer analysiert.

2.2.4.2. Intrazelluläre FACS-Färbung

Für die intrazelluläre FACS-Färbung müssen die Zellen fixiert und permeabilisiert werden, damit der Antikörper gegen das intrazelluläre Antigen in die Zelle gelangen und an sie binden kann. Dabei wurde den Zellen nach Oberflächenmarkierung mit extrazellulären Antikörpern je 1ml der Fixierlösung hinzugefügt und für 12 Stunden bei 4°C inkubiert. Anschließend wurden die Proben 2x mit Permeabilization-Puffer ("Perm-Wash") gewaschen (2ml, 5 min, 4°C, 1500 rpm), um die Zellmembran für die intrazelluläre Antikörperbindung durchgängig zu machen. Im Anschluss an die Fixierung wurden die konjugierten Antikörper hinzugegeben. Die Inkubation erfolgte bei 4°C für mindestens 30 min. Die Zugabe von konjugierten Antikörpern muss nach der Fixierung erfolgen, da ansonsten die Bindung durch die Fixierlösung zerstört wird.

Nach zwei weiteren Waschschritten mit "Perm-Wash" (2ml, 5 min, 4°C, 1500 rpm, Überstand verwerfen) wurden die Zellen in 300µl Stain-Puffer resuspendiert und mittels Durchflusszytometrie analysiert.

2.2.5. Kultivierung von humanen Leukozyten aus dem peripheren Blut mit Sildenafil ex vivo

Für die Kultivierung von humanen Leukozyten wurden periphere mononukleäre Zellen ("peripheral blood mononuclear cells", PBMC) aus frischem Vollblut von gesunden Probanden oder aus sogenannten "Buffy Coats" (Lymphozytenkonzentrat nach Abzentrifugieren von Vollblut) isoliert. Das Prinzip beruht auf einer Dichtegradienten-Zentrifugation, wodurch sich die einzelnen Blutbestandteile (Erythrozyten, Thrombozyten, Leukozyten, Plasma) aufgrund ihrer spezifischen Dichte separieren lassen. Dabei wurden zwei 50ml Falcon-Röhrchen mit jeweils 25ml einer synthetischen Polymerlösung (Biocoll Separating Solution, Dichte 1.077g/ml) gefüllt und anschließend jeweils 25ml des gerinnungsunfähig gemachten Blutes sehr langsam aufgelagert, sodass es zu keiner Vermischung der beiden Suspensionen kommt. Bei der nachfolgenden Zentrifugierung (23°C, 1800 rpm, 30 min, Beschleunigungs- und Abbremsstufe = 0) werden Erythrozyten und polymorphkernige Leukozyten oder Granulozyten aufgrund ihrer höheren Dichte durch die synthetische Polymerlösung hindurchzentrifugiert und am Boden der Röhrchen als Zellsediment abgesetzt. Mononukleäre Zellen (Lymphozyten und einige Monozyten) sammeln sich über der Polymerlösung ("Interphase") an und trennen Plasma von Polymerlösung.

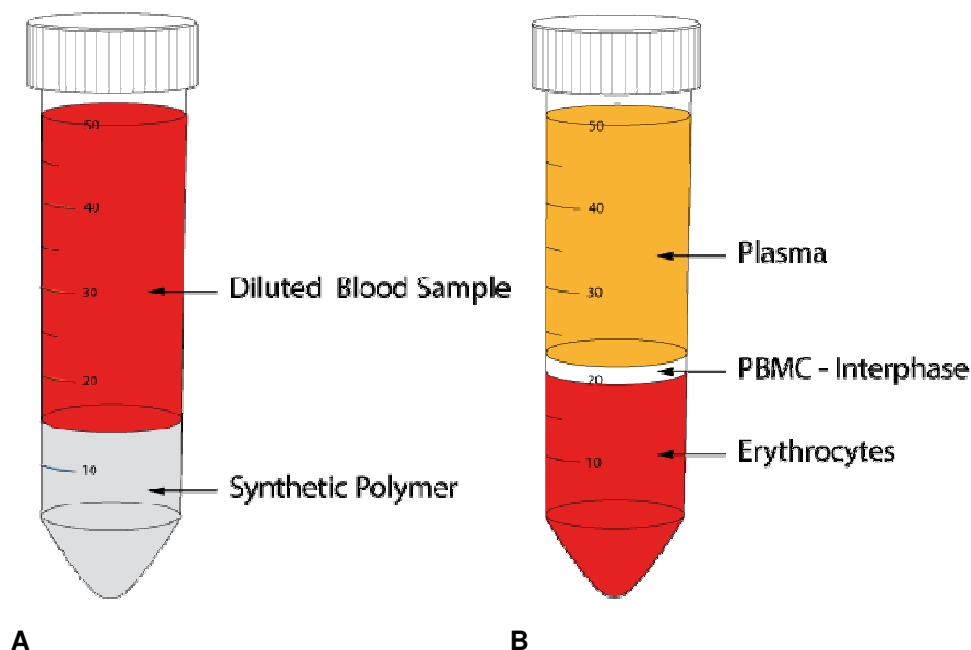


Abb. 2.2.5.1. Prinzip der Dichtegradienten-Zentrifugation

A: vor Zentrifugierung; B: nach Zentrifugierung; Quelle: <http://pluriselect.com/buffy-coat.html>

Anschließend wurde die PBMC-Interphase vorsichtig mit Hilfe einer 3ml Transferpipette abgenommen und in ein neues 50ml Falcon-Röhrchen übergeführt. Danach wurde die Probe mit PBS/EDTA bis zur Obergrenze aufgefüllt und 3-4mal gewaschen (PBS/EDTA, 23°C, 1500 rpm, 7 min, Beschleunigungs- und Abbremsstufe = 9, Überstand verwerfen, resuspendieren). Nach dem letzten Waschschrift erfolgte die Zellzahlbestimmung mit Hilfe von Tryptanblau und Neubauer-Zählkammer. Nach Anpassung der gewünschten Zellzahl von 1×10^6 Zellen/ml wurde die Probe abzentrifugiert (4°C, 1200 rpm, 10 min, Überstand verwerfen), anschließend mit 32ml Zellkulturmedium aufgefüllt, resuspendiert, auf Mikrotiterplatten (6-well-Platte, je 4ml Medium) verteilt und für 1 – 1,5 Stunden bei 37°C zum Ruhen in den Inkubator gestellt. Abschließend wurden je 4µl der Sildenafil-Stammlösung, der 1. Verdünnung und der 2. Verdünnung hinzugegeben, um die Behandlungskonzentrationen von 7,5µM, 750 nM und 75 nM zu erhalten. Die darauffolgende Inkubation mit Sildenafil bei 37°C im Brutschrank dauerte 24 Stunden.

Nach der Inkubation wurden die Zellen mit Hilfe von Zellschabern vom Boden gelöst und in Röhrchen übergeführt, gewaschen (5°C, 1200 rpm, 7 min, Überstand verwerfen) und die Zellzahl bestimmt. Bevor nun die Antikörperzugabe erfolgte, wurden die Fc-Rezeptoren auf den zu färbenden Zellen blockiert, um eine unspezifische Hintergrundfärbung zu verhindern. Dabei wurden 10µl des Blocking Reagent pro 10^7 Zellen hinzugegeben, gut vermischt und für 10 min bei 4°C inkubiert. Anschließend folgte die Anpassung der Konzentrationen der Zellsuspensionen an 1×10^6 Zellen pro 50µl und die Zusetzung der Antikörper für die extrazelluläre Oberflächenmarkierung in den spezifischen Mengen. Nach einer Inkubationszeit von 20 min bei 4°C wurden die Zellen zweimal gewaschen (200µl FACS-Puffer, 4°C, 1500 rpm, 5 min, Überstand verwerfen) und die Proben für die intrazelluläre FACS-Färbung mit 1ml Fixierlösung versehen und 12 Stunden inkubiert. Die Proben mit biotinkonjugierten Antikörpern wurden nach dem Waschen mit fluoreszenzmarkiertem Streptavidin versetzt, 15 min inkubiert und gewaschen. Abschließend wurden die Zellen in 300µl FACS-Puffer resuspendiert und mittels Durchflusszytometrie analysiert. Die Weiterverarbeitung der Proben für die intrazelluläre FACS-Färbung erfolgte nach dem oben genannten Protokoll (siehe Punkt 2.2.4.2. Intrazelluläre FACS-Färbung).

3. Ergebnisse

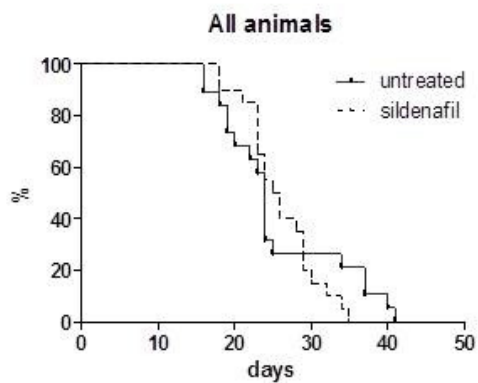
3.1. Effekte von Sildenafil auf das Tumorwachstum, die Metastasierungsrate und das Überleben der Mäuse mit Pankreaskarzinom

Anhand von verschiedenen Tumortransplantationsmodellen konnte gezeigt werden, dass die orale Behandlung mit dem Phosphodiesterase-5 Inhibitor Sildenafil das Tumorwachstum verlangsamen kann (Serafini et al. 2006). Auch konnte beim malignen Melanom eine signifikant verbesserte Überlebensrate festgestellt und eine Stabilisierung des Tumorwachstums erreicht werden (Meyer et al. 2011).

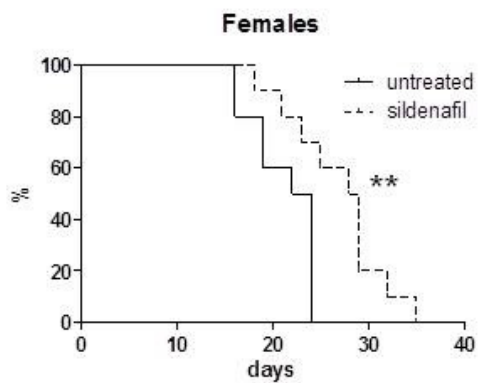
Zur Beurteilung der Effekte der Behandlung wurde Sildenafil den Tieren ab dem 5. Tag post-op über das Trinkwasser verabreicht. Eine zweite Gruppe Mäuse wurde als Kontrollgruppe herangezogen.

3.1.1. Effekte auf das Überleben

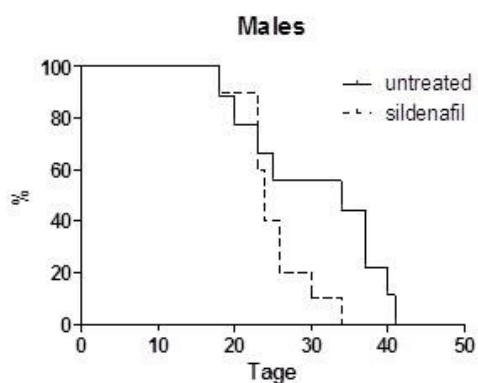
Die Ergebnisse der Sildenafilbehandlung in Bezug auf das Überleben sind in Abb. 3.1.1.1. dargestellt. Dabei scheint die Behandlung mit Sildenafil auf den ersten Blick allgemein keine Vorteile auf die Überlebensdauer zu haben. Betrachtet man jedoch die weiteren, nach Geschlecht getrennten Analysen, so kann ein deutlicher Unterschied festgestellt werden. Bei den weiblichen Tieren wird durch die Behandlung mit Sildenafil eine signifikante Verbesserung der Überlebensrate erreicht (** $p < 0.01$). Das Ergebnis der männlichen Tiere weist keine verbesserte Überlebensrate auf und lässt dagegen eher eine Tendenz zu negativen Auswirkungen erkennen.



| | |
|-----------------------------|-----------------|
| Log-rank (Mantel-Cox) Test | |
| P value | 0.6383 |
| Gehan-Breslow-Wilcoxon Test | |
| P value | 0.4442 |
| Median survival | |
| untreated | 24.00 |
| sildenafil | 25.50 |
| Ratio | 0.9412 |
| 95% CI of ratio | 0.4075 to 1.475 |
| Hazard Ratio | |
| Ratio | 0.8412 |
| 95% CI of ratio | 0.4090 to 1.730 |



| | |
|-----------------------------|-----------------|
| Log-rank (Mantel-Cox) Test | |
| P value | 0.0084 |
| Gehan-Breslow-Wilcoxon Test | |
| P value | 0.0156 |
| Median survival | |
| untreated | 23.00 |
| sildenafil | 28.50 |
| Ratio | 0.0807 |
| 95% CI of ratio | 0.3908 to 1.223 |
| Hazard Ratio | |
| Ratio | 5.001 |
| 95% CI of ratio | 1.511 to 16.55 |



| | |
|-----------------------------|-----------------|
| Log-rank (Mantel-Cox) Test | |
| P value | 0.0624 |
| Gehan-Breslow-Wilcoxon Test | |
| P value | 0.2309 |
| Median survival | |
| untreated | 34.00 |
| sildenafil | 24.00 |
| Ratio | 1.417 |
| 95% CI of ratio | 1.010 to 1.823 |
| Hazard Ratio | |
| Ratio | 0.3447 |
| 95% CI of ratio | 0.1124 to 1.057 |

Abb.3.1.1.1. Effekte der Behandlung mit Sildenafil auf das Überleben der Mäuse mit Pankreaskarzinom. Mäuse wurden ab dem 5. Tag post-op über das Trinkwasser mit Sildenafil behandelt und das Überleben mittels Kaplan-Meier Kurven statistisch erfasst. (all animals n = 20 pro Gruppe; female/male n = 10 pro Gruppe; **p<0.01)

3.1.2. Effekte auf Tumorzvolumen und Tumorzgröße

Betrachtet man die Auswirkungen der Sildenafilbehandlung auf Tumorzvolumen und Tumorzgröße allgemein lässt sich kein signifikanter Unterschied diesbezüglich erkennen. Unterscheidet man jedoch wieder bezüglich des weiblichen und männlichen Geschlechts, führt Sildenafil bei den weiblichen Tieren zu einem größeren Tumorzvolumen und einem Anstieg der Tumorzgröße (Abb. 3.1.2.1). Eine Hypothese dieser Auswirkungen stellt die verringerte MDSC Anreicherung im Tumorgewebe mit gleichzeitigem Anstieg tumorinfiltrierender Lymphozyten dar.

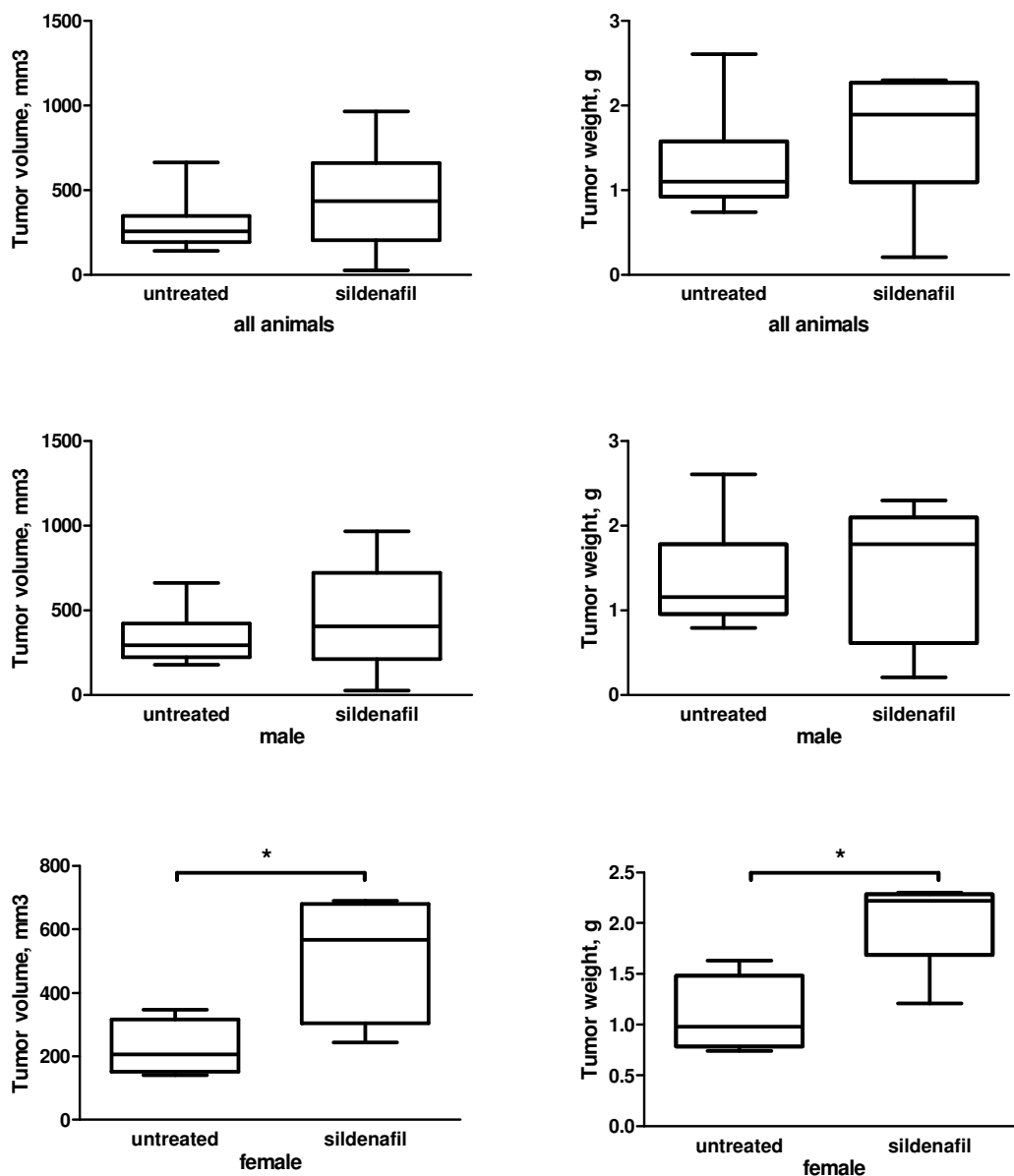


Abb.3.1.2.1. Effekte der Behandlung mit Sildenafil auf Tumorzvolumen und Tumorzgröße der Mäuse mit Pankreaskarzinom. Über einen Zeitraum von 15 Tagen wurde mit Sildenafil behandelt und Tumorzvolumen/-größe statistisch erfasst. (SE; all animals n = 12 Kontrollgruppe, n = 14 Sildenafil; female n = 4 Kontrollgruppe, n = 5 Sildenafil; male n = 8 Kontrollgruppe, n = 9 Sildenafil; *p<0.05)

3.1.3. Effekte auf die Metastasierungsrate

In Bezug auf die Metastasierungsrate hatte Sildenafil keinen signifikanten Einfluss. Die Ergebnisse sind in Abb. 3.1.3.1. dargestellt.

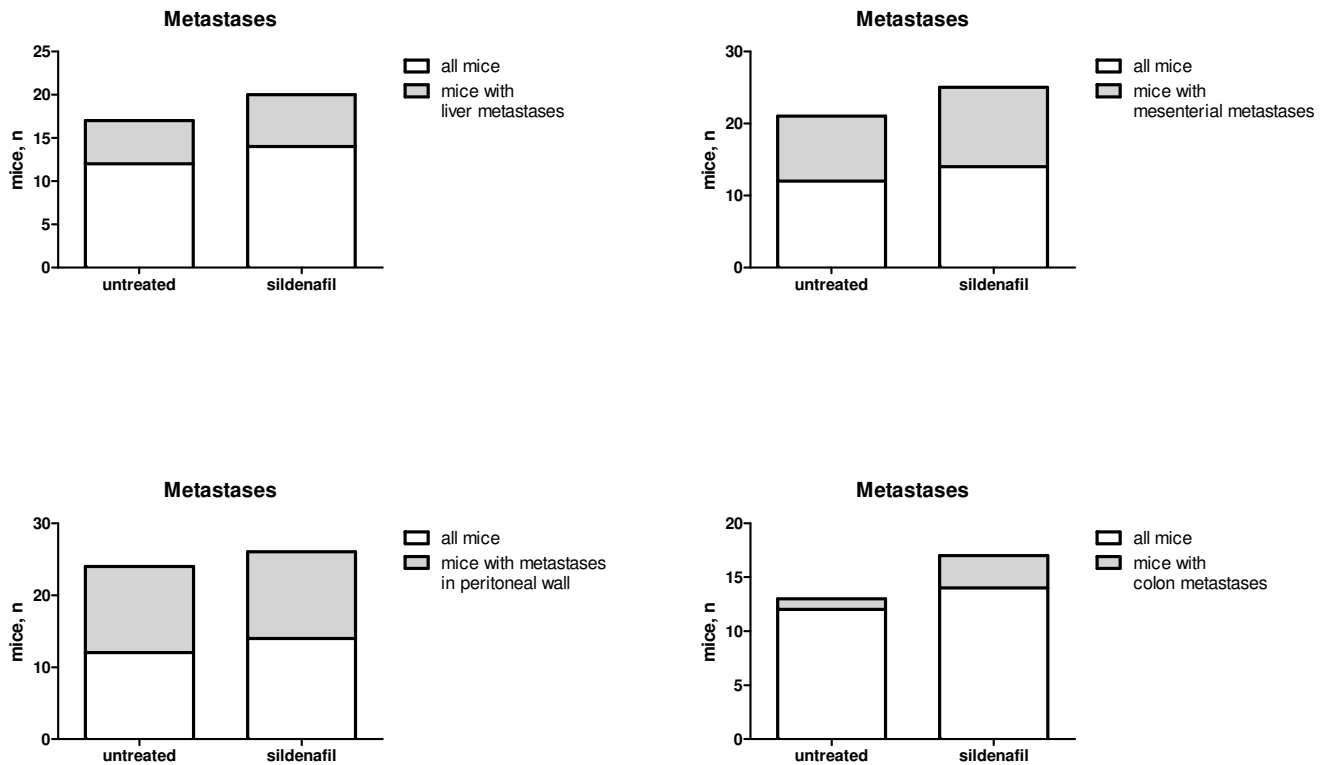


Abb.3.1.3.1. Effekte der Behandlung mit Sildenafil auf die Metastasierungsrate der Mäuse mit Pankreaskarzinom. Über einen Zeitraum von 15 Tagen wurde mit Sildenafil behandelt und die Metastasierungsrate statistisch mittels Chi-Quadrat erfasst. (n = 12 - 14)

3.2. Phänotypische Charakterisierung von Leukozyten in Tumoren nach der Behandlung mit Sildenafil

In einem nächsten Schritt wurden die Primärtumoren behandelter Mäuse auf Leukozyten phänotypisch untersucht. Dabei wurden Einzelzellsuspensionen der Tumoren hergestellt, mit den spezifischen Antikörpern inkubiert und durchflusszytometrisch bestimmt. Die Auswertestrategie der Phänotypisierung ist in Abb. 3.2.1. dargestellt.

Der Anteil an CD4⁺ und CD8⁺ T-Lymphozyten ist allgemein betrachtet unter Sildenafilbehandlung nicht signifikant verändert. Es besteht lediglich eine Tendenz, dass mehr CD8⁺ T_{cm} vorhanden sind (Abb. 3.2.2. p = 0.053).

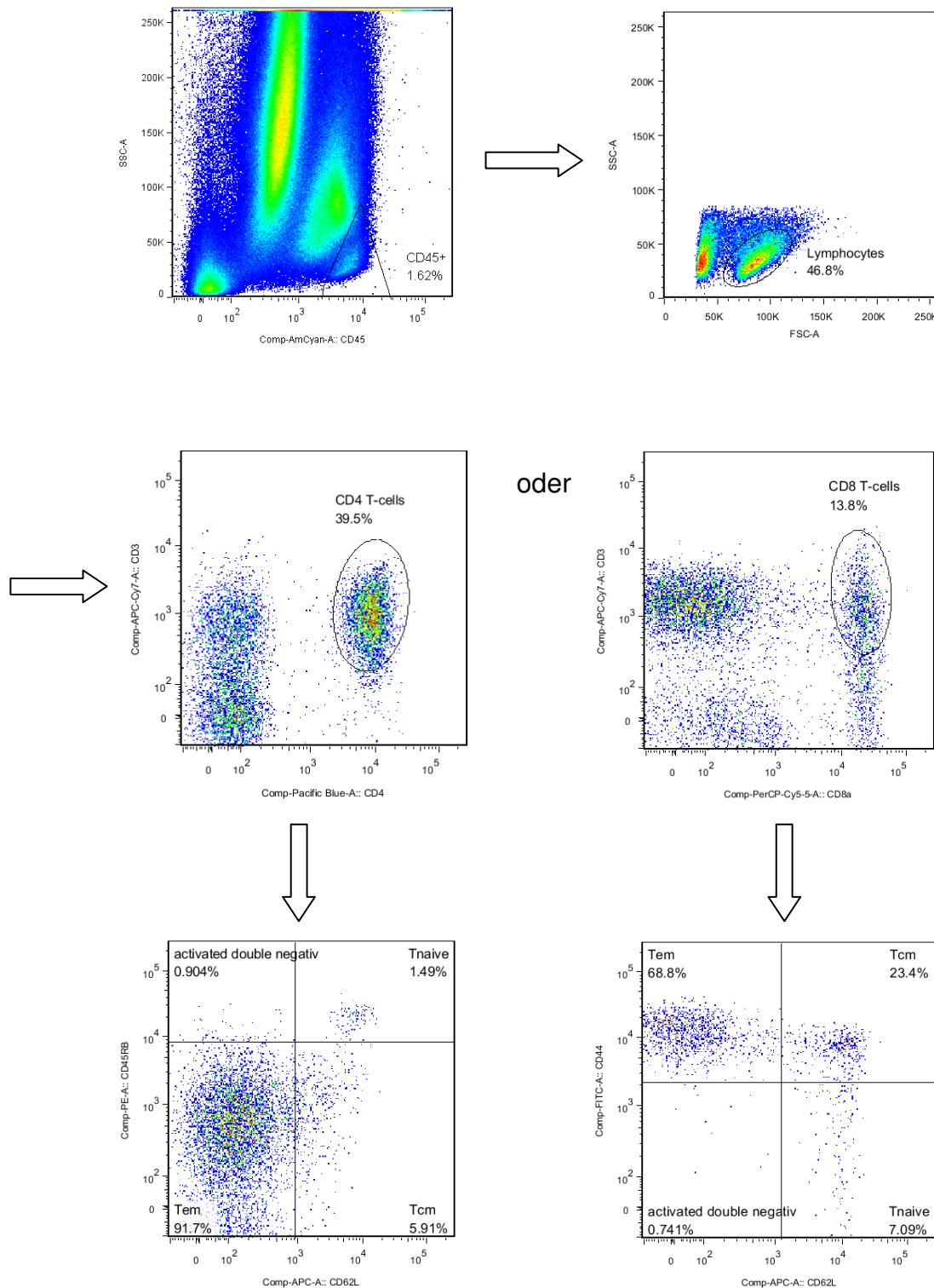


Abb.3.2.1. Auswertestrategie zur durchflusszytometrischen Bestimmung von T-Lymphozyten im Primärtumor (Dotplot). Anhand des Markers CD45 wurden Tumorzellen von Leukozyten getrennt und anschließend auf lebende Lymphozyten selektiert. Danach folgte die weitere Einteilung in CD4⁺ T-Zellen und CD8⁺ T-Zellen mit anschließender Selektierung in naive T-Zellen (T_{naive}) und Gedächtniszellen: effector memory T-Zellen (T_{em}), central memory T-Zellen (T_{cm}).

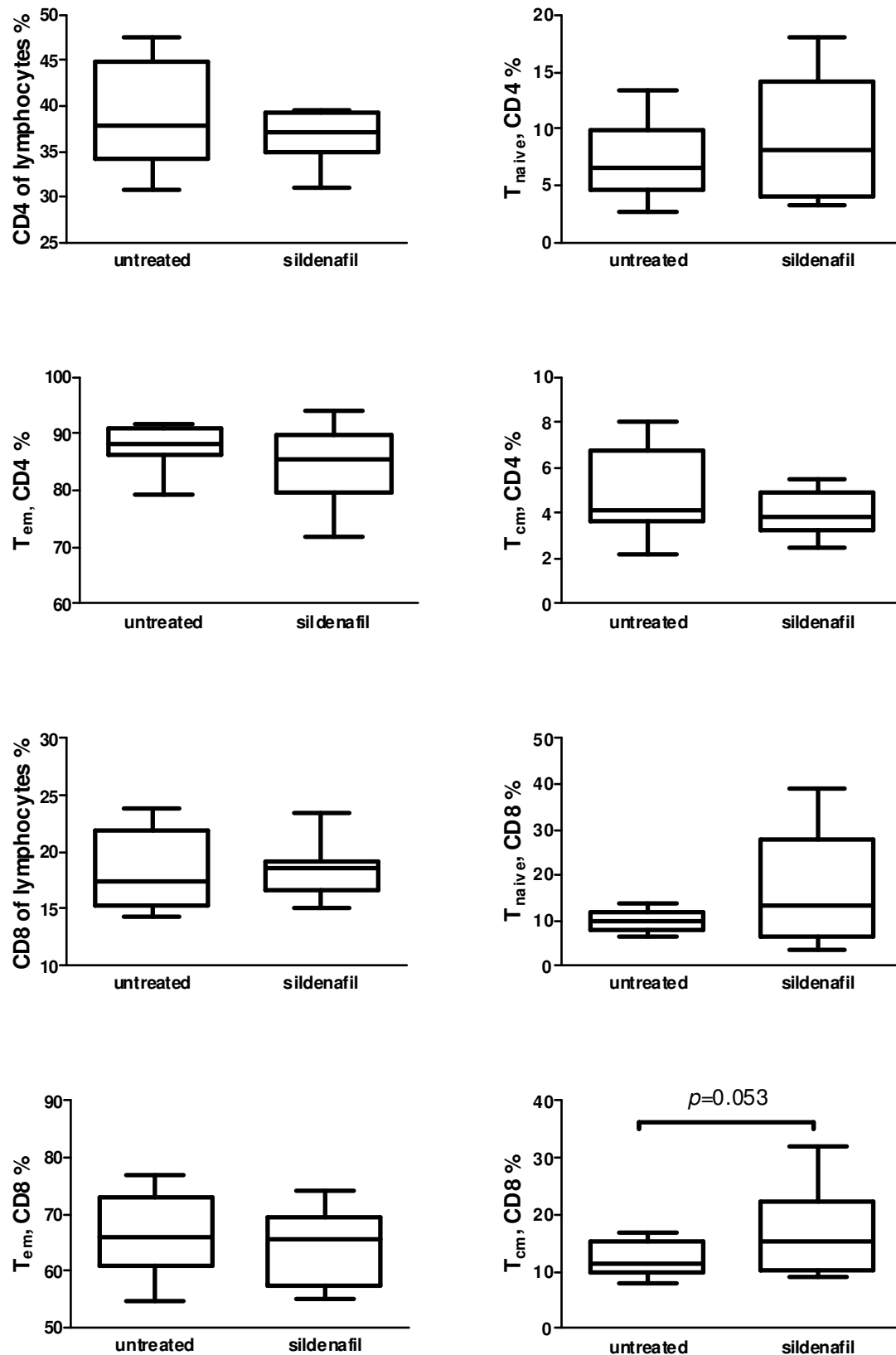


Abb.3.2.2. Quantifizierung der Lymphozytenpopulationen in Primärtumoren tumortragender Mäuse mit und ohne Sildenafilbehandlung mittels FACS. Einzelzellsuspensionen der Tumoren wurden mit spezifischen Antikörpern inkubiert, anschließend die Anzahl spezifischer T-Zell-Populationen durchflusszytometrisch bestimmt und statistisch mittels unpaired *T*-test erfasst (SE, n = 12-14)

Beim männlichen Geschlecht ist eine Tendenz des Absinkens von der Anzahl an $CD4^+$ T-Zellen und T_{em} zu erkennen (Abb.3.2.3. $p=0.058$, $p=0.06$), was wiederum beim weiblichen Geschlecht nicht der Fall ist (Abb.3.2.3.). Bei den Weibchen (im Gegenteil zu den Männchen) kommt es zu einem signifikanten Anstieg an naiven $CD8^+$ T-Zellen (Abb.3.2.4.).

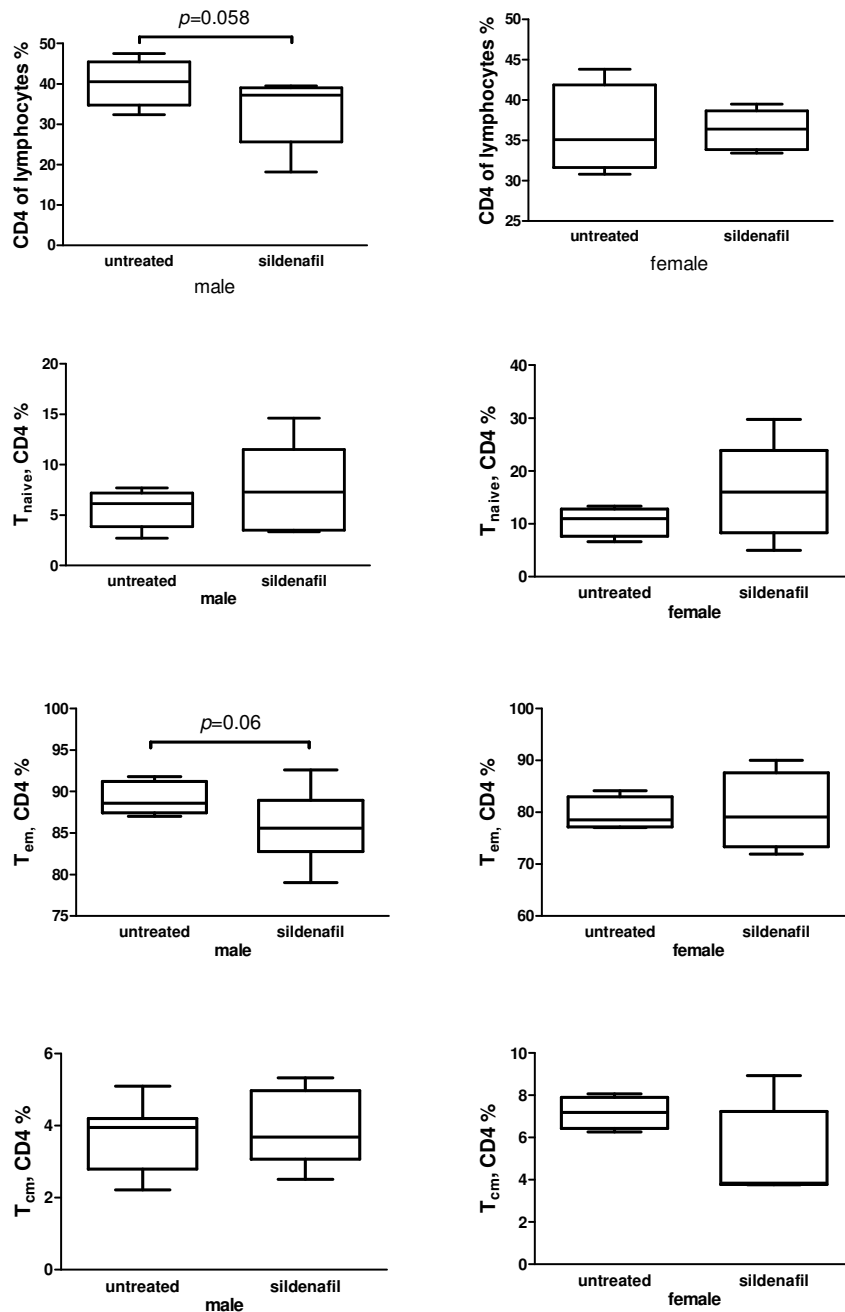


Abb.3.2.3. Quantifizierung von $CD4^+$ T-Zellen und deren Subpopulationen in Primärtumoren tumortragender weiblicher und männlicher Mäuse mit und ohne Sildenafilbehandlung. Einzelzellsuspensionen der Tumoren wurden mit spezifischen Antikörpern inkubiert, anschließend $CD4^+$ T-Zellen durchflusszytometrisch bestimmt und statistisch mittels unpaired *T*-test erfasst (SE, $n = 12-14$)

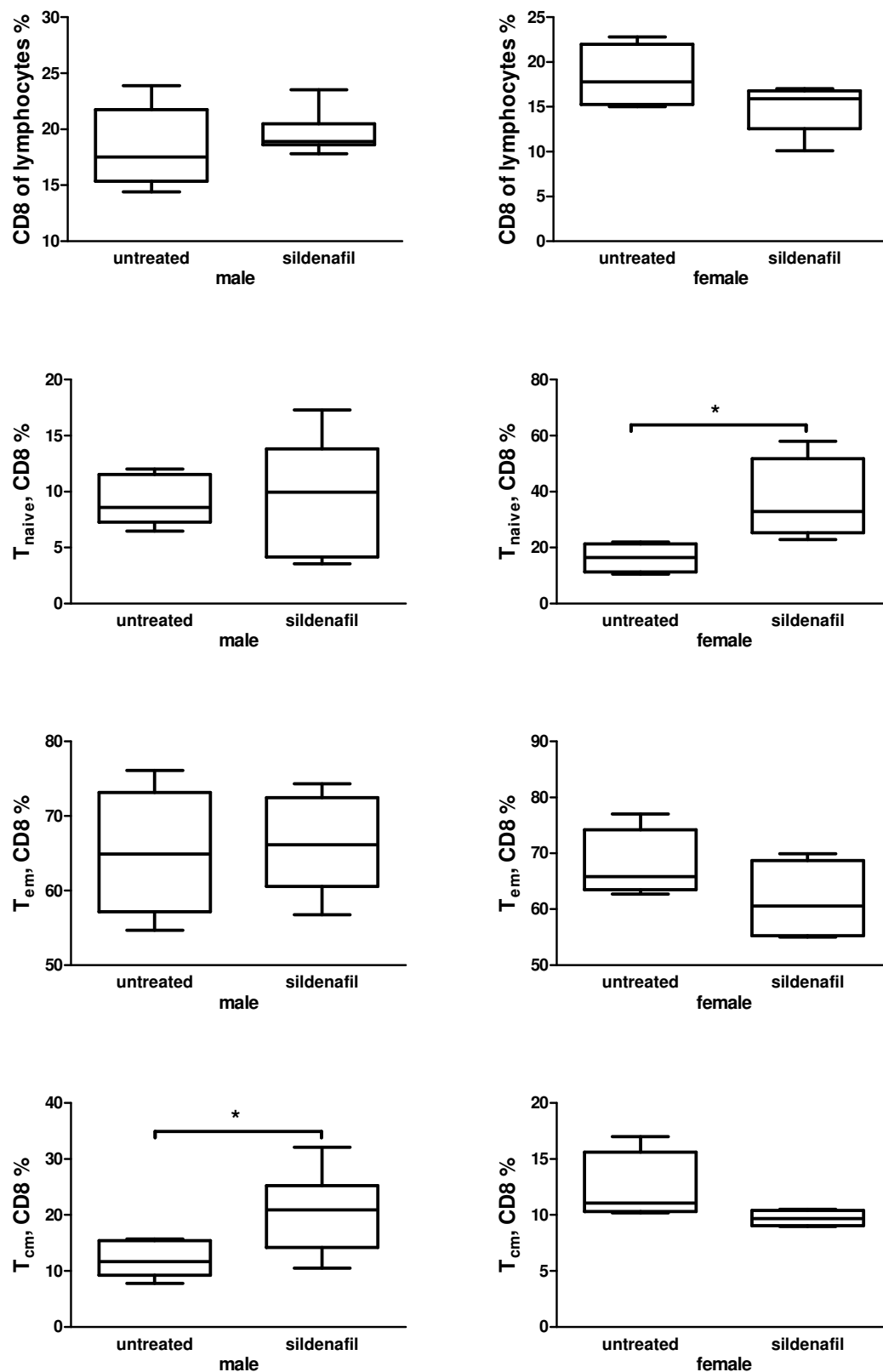


Abb.3.2.4. Quantifizierung von CD8⁺ T-Zellen und deren Subpopulationen in Primärtumoren tumortragender weiblicher und männlicher Mäuse mit und ohne Sildenafilbehandlung. Einzelzellsuspensionen der Tumoren wurden mit spezifischen Antikörpern inkubiert, anschließend CD8⁺ T-Zellen durchflusszytometrisch bestimmt und statistisch mittels unpaired *T*-test erfasst (SE, n = 12-14, *p < 0.05)

Als weiterer Schritt wurden die Anzahl regulatorischer T-Zellen und deren Subpopulationen, sowie NK- und NK-T-Zellen gemessen. Die Auswertestrategie hierfür ist in Abb. 3.2.5. dargestellt. Die Ergebnisse brachten sowohl zusammenfassend als auch in Bezug auf das Geschlecht keine signifikanten Veränderungen (Abb. 3.2.6. und Abb. 3.2.7.).

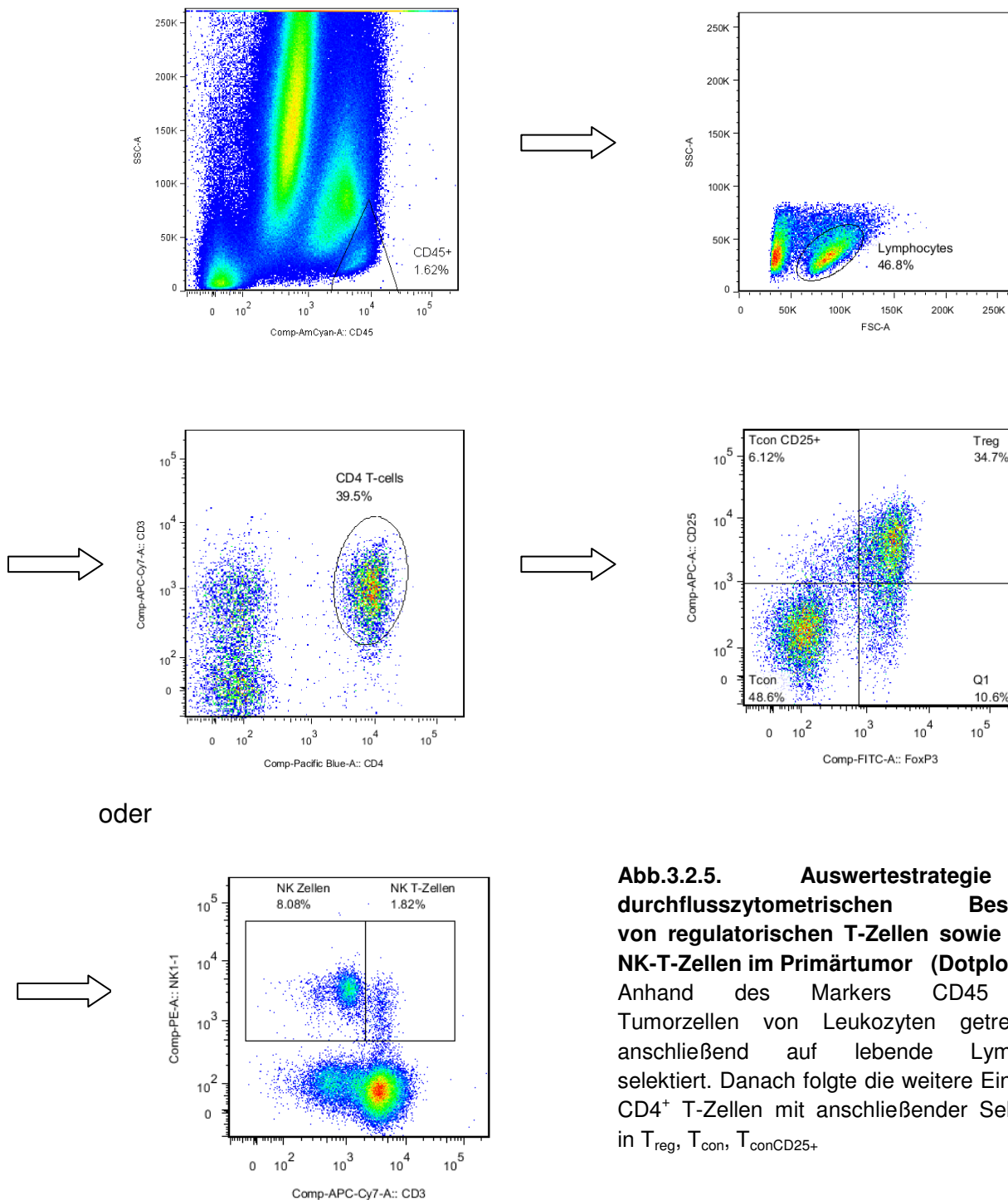


Abb.3.2.5. Auswertestrategie zur durchflusszytometrischen Bestimmung von regulatorischen T-Zellen sowie NK- und NK-T-Zellen im Primärtumor (Dotplot).

Anhand des Markers CD45 wurden Tumorzellen von Leukozyten getrennt und anschließend auf lebende Lymphozyten selektiert. Danach folgte die weitere Einteilung in $CD4^+$ T-Zellen mit anschließender Selektierung in T_{reg} , T_{con} , $T_{conCD25+}$

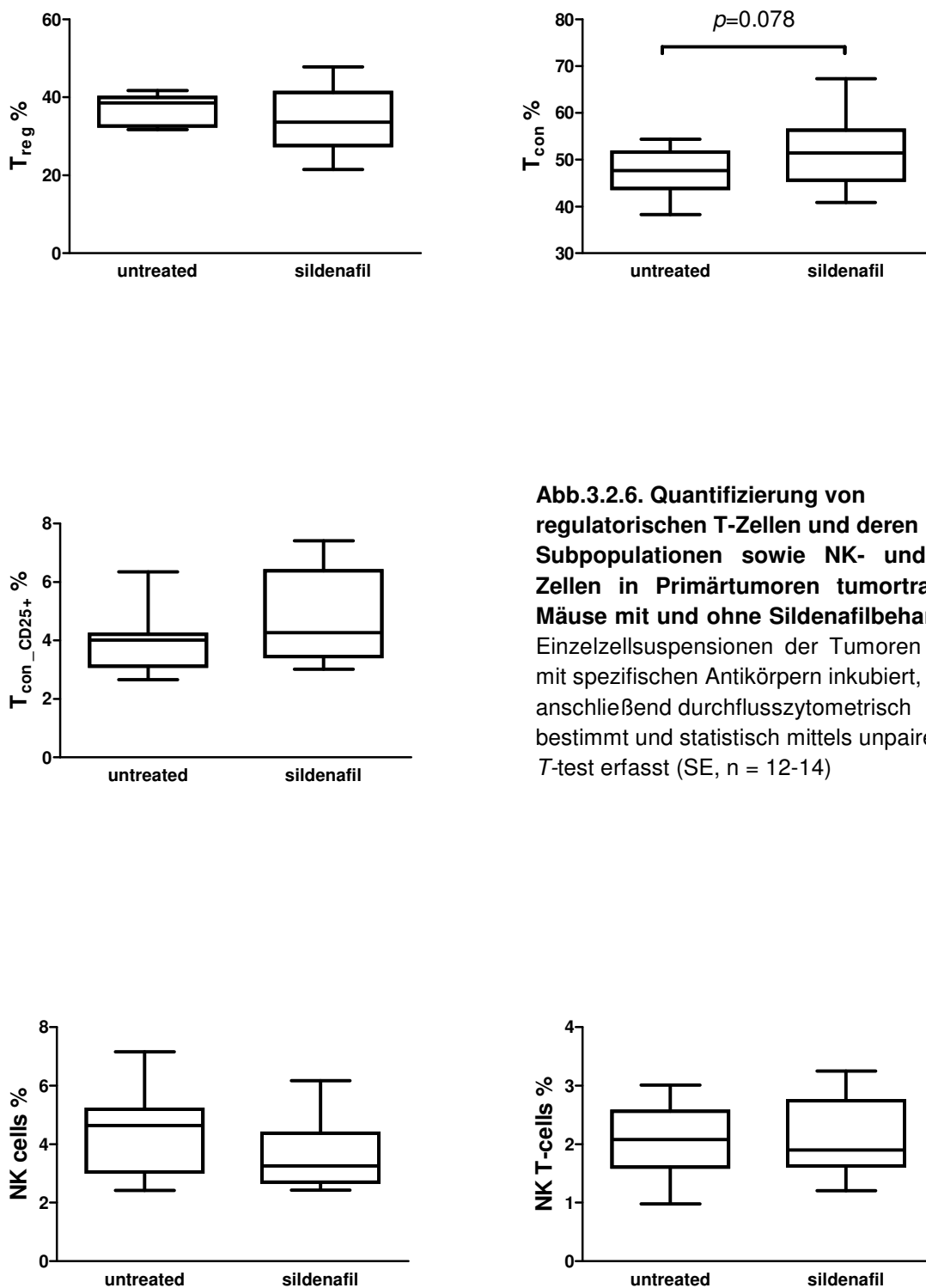


Abb.3.2.6. Quantifizierung von regulatorischen T-Zellen und deren Subpopulationen sowie NK- und NK-T-Zellen in Primärtumoren tumortragender Mäuse mit und ohne Sildenafilbehandlung. Einzelzellsuspensionen der Tumoren wurden mit spezifischen Antikörpern inkubiert, anschließend durchflusszytometrisch bestimmt und statistisch mittels unpaired T-test erfasst (SE, n = 12-14)

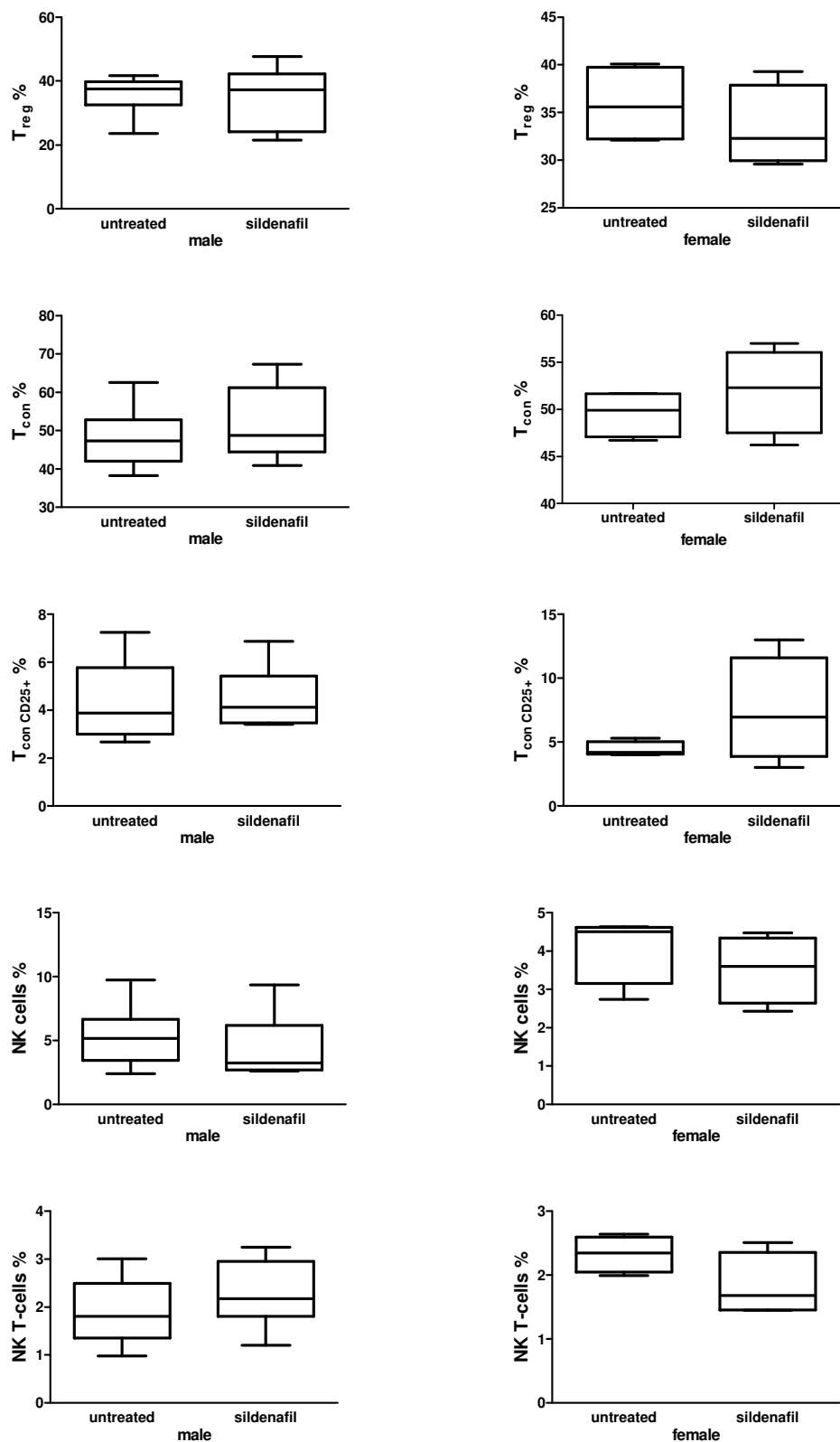


Abb.3.2.7. Quantifizierung von regulatorischen T-Zellen und deren Subpopulationen sowie NK- und NK-T-Zellen in Primärtumoren tumortragender weiblicher und männlicher Mäuse mit und ohne Sildenafilbehandlung. Einzelzellsuspensionen der Tumoren wurden mit spezifischen Antikörpern inkubiert, anschließend durchflusszytometrisch bestimmt und statistisch mittels unpaired T-test erfasst (SE, n = 12-14)

Neben der Analyse von T-Lymphozyten und regulatorischen T-Zellen war es von besonderem Interesse, das Primärtumorgewebe auf myeloide Suppressorzellen zu untersuchen. Hier erfolgte ebenfalls die Auswertung mittels FACS-Analysen nach Inkubation mit den spezifischen Antikörpern.

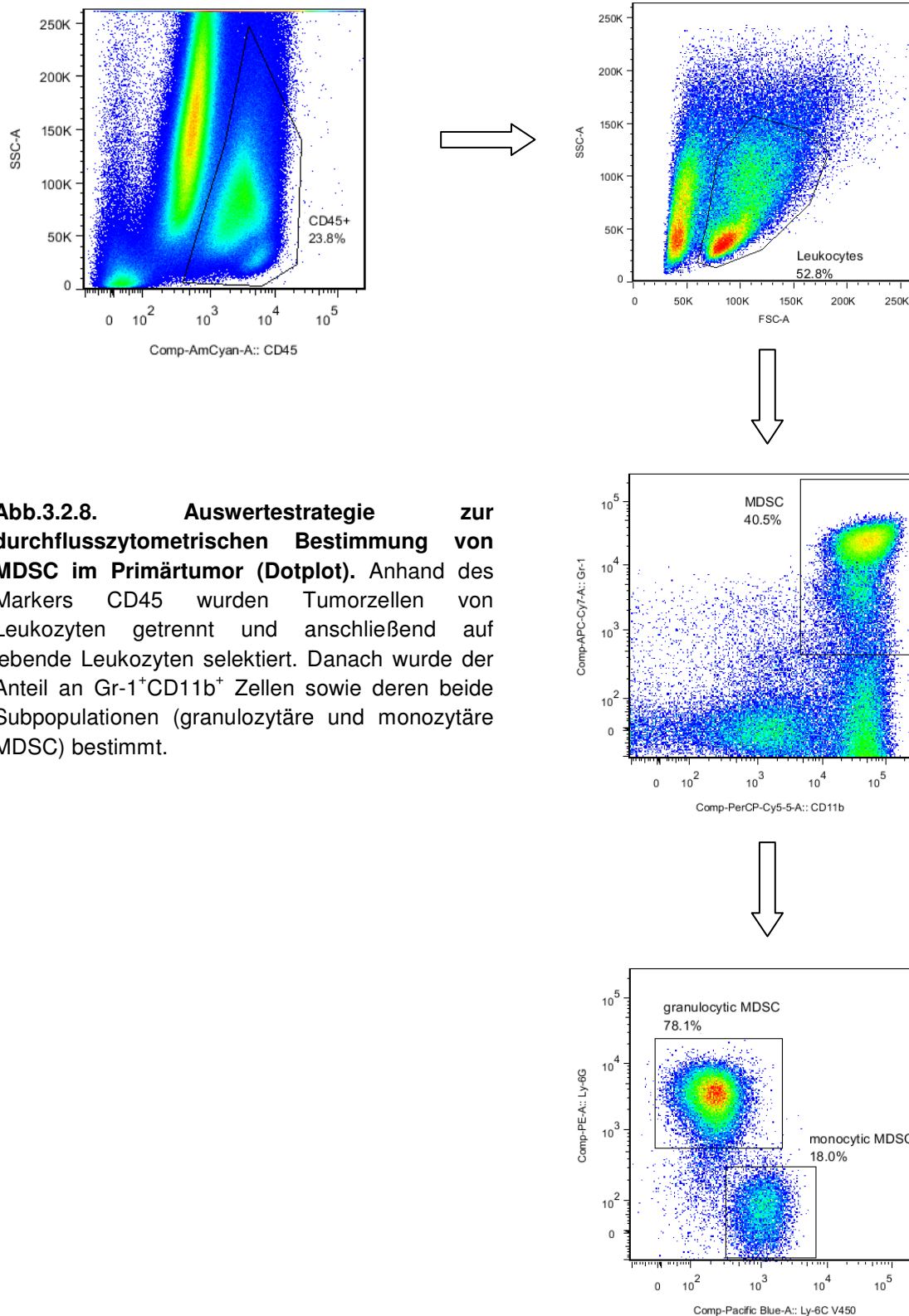


Abb.3.2.8. Auswertestrategie zur durchflusszytometrischen Bestimmung von MDSC im Primärtumor (Dotplot). Anhand des Markers CD45 wurden Tumorzellen von Leukozyten getrennt und anschließend auf lebende Leukozyten selektiert. Danach wurde der Anteil an Gr-1⁺CD11b⁺ Zellen sowie deren beide Subpopulationen (granulozytäre und monozytäre MDSC) bestimmt.

Abb. 3.2.9. und Abb. 3.2.10. fassen die gemessenen Ergebnisse zusammen. Dabei ist hinsichtlich der MDSC-Gesamtpopulation keine Veränderung zu entnehmen. Teilt man diese jedoch in die beiden Subpopulationen (granulozytäre und monozytäre MDSC) auf, ist unter Sildenafilbehandlung eine deutlich signifikante Reduzierung der Anzahl an MDSC im Primärtumorgewebe festzustellen (Abb.3.2.9.). Diese Reduzierung betrifft jedoch nur die weiblichen Tiere (Abb. 3.2.10). Durch diese Erkenntnisse wird der positive Effekt von Sildenafil in Bezug auf die signifikant verlängerte Überlebensrate bestärkt. Die ausbleibende Reduzierung der Anzahl an MDSC beim männlichen Tier spiegelt sich in einer schlechteren Überlebensrate wieder.

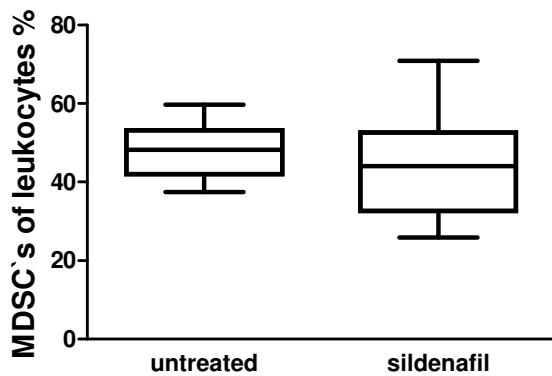
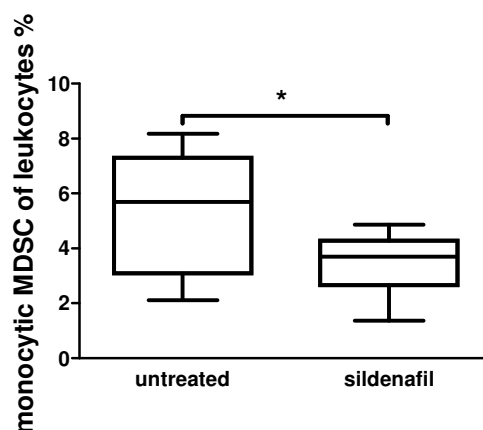
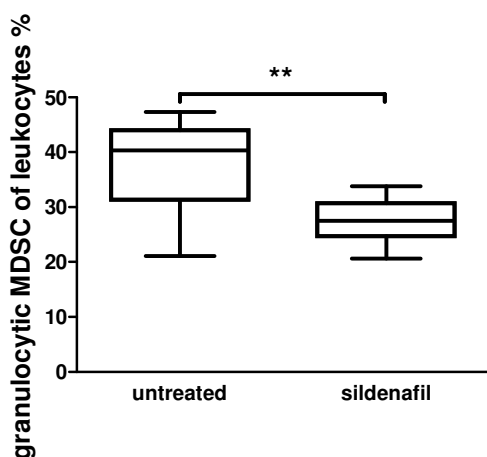


Abb.3.2.9. Quantifizierung von MDSC und deren beiden Subpopulationen in Primärtumoren tumortragender Mäuse mit und ohne Sildenafilbehandlung.

Einzelzellsuspensionen der Tumoren wurden mit spezifischen Antikörpern inkubiert, anschließend durchflusszytometrisch bestimmt und mittels unpaired T-test erfasst (SE, n = 12-14, *p<0.05, **p<0.01)



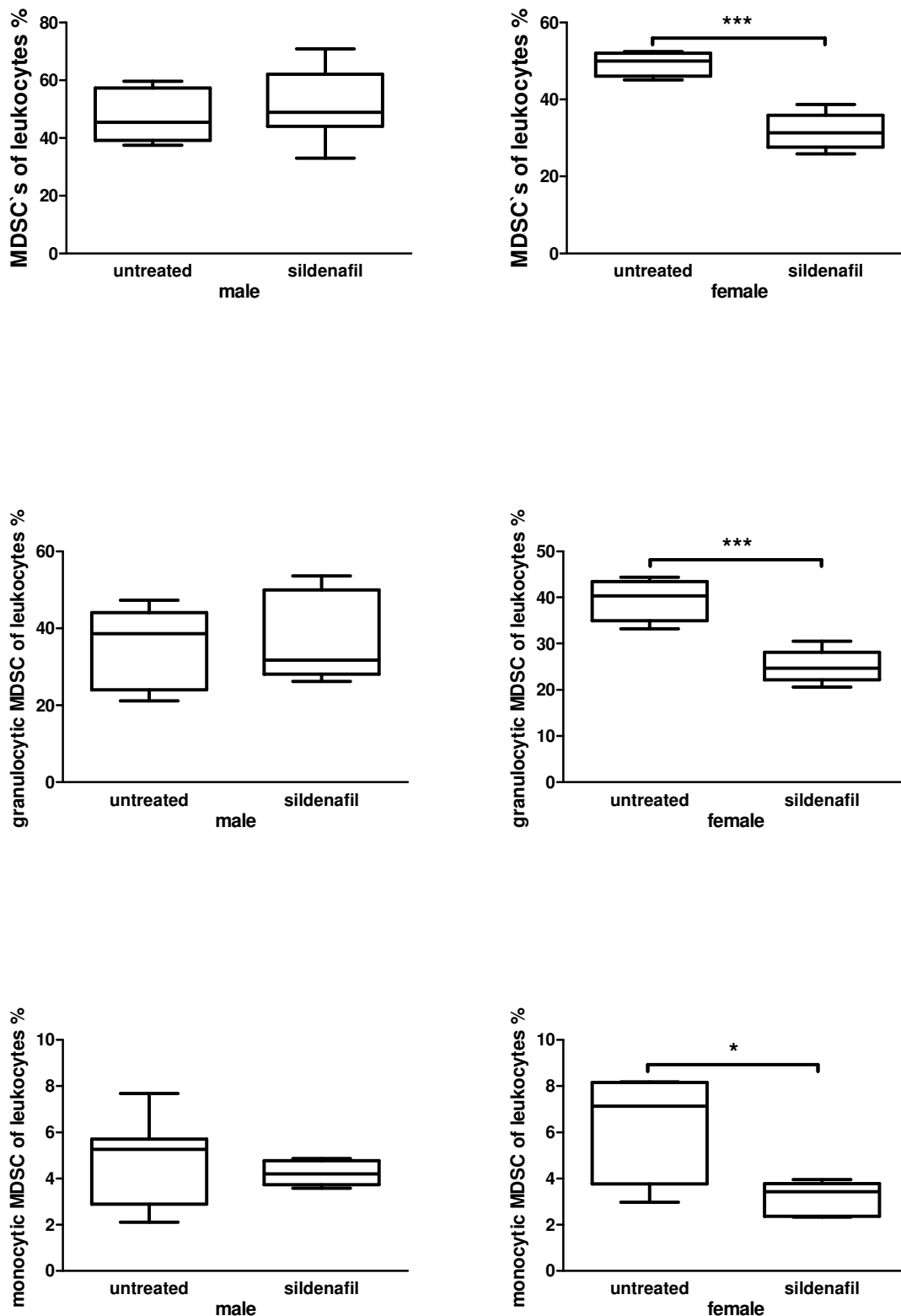


Abb.3.2.10. Quantifizierung von MDSC und deren beiden Subpopulationen in Primärtumoren tumortragender weiblicher und männlicher Mäuse mit und ohne Sildenafilbehandlung. Einzelzellsuspensionen der Tumoren wurden mit spezifischen Antikörpern inkubiert, anschließend durchflusszytometrisch bestimmt und statistisch mittels unpaired *T*-test erfasst (SE, $n = 12-14$, * $p < 0.05$; *** $p < 0.001$)

In Bezug auf die durchflusszytometrische Bestimmung von dendritischen Zellen brachte die Behandlung mit Sildenafil keine wesentlichen Veränderungen. Es konnte lediglich eine Herunterregulierung plasmazytoider DC's festgestellt werden (Abb. 3.2.12. * $p < 0.05$). Unterschiede bezüglich der Reifungsmarker CD80 und CD86 waren im Allgemeinen nicht zu beobachten (Abb. 3.2.12). Abb. 3.2.11. stellt die verwendete Auswertestrategie dar.

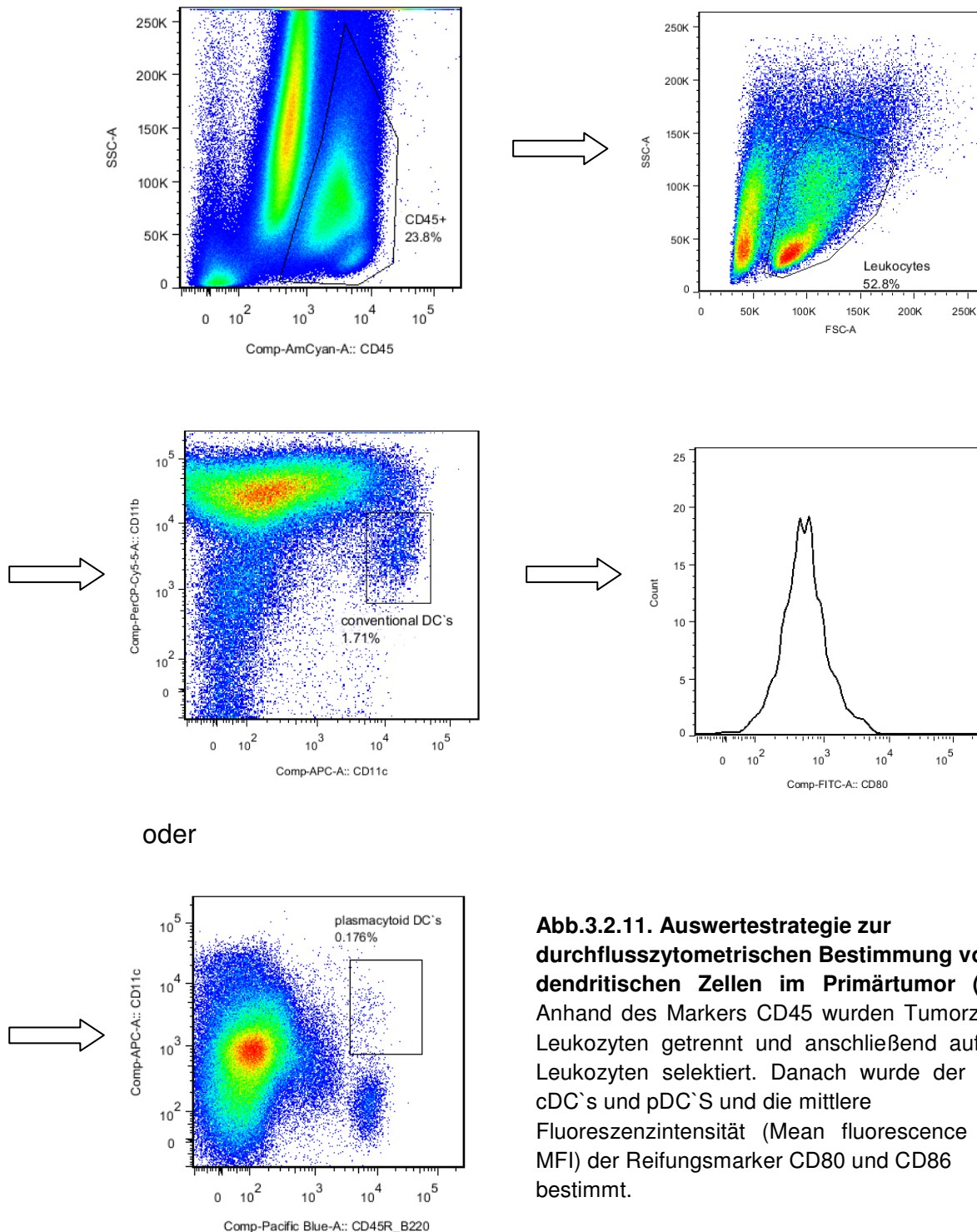


Abb.3.2.11. Auswertestrategie zur durchflusszytometrischen Bestimmung von dendritischen Zellen im Primärtumor (Dotplot). Anhand des Markers CD45 wurden Tumorzellen von Leukozyten getrennt und anschließend auf lebende Leukozyten selektiert. Danach wurde der Anteil an cDC's und pDC's und die mittlere Fluoreszenzintensität (Mean fluorescence intensity, MFI) der Reifungsmarker CD80 und CD86 bestimmt.

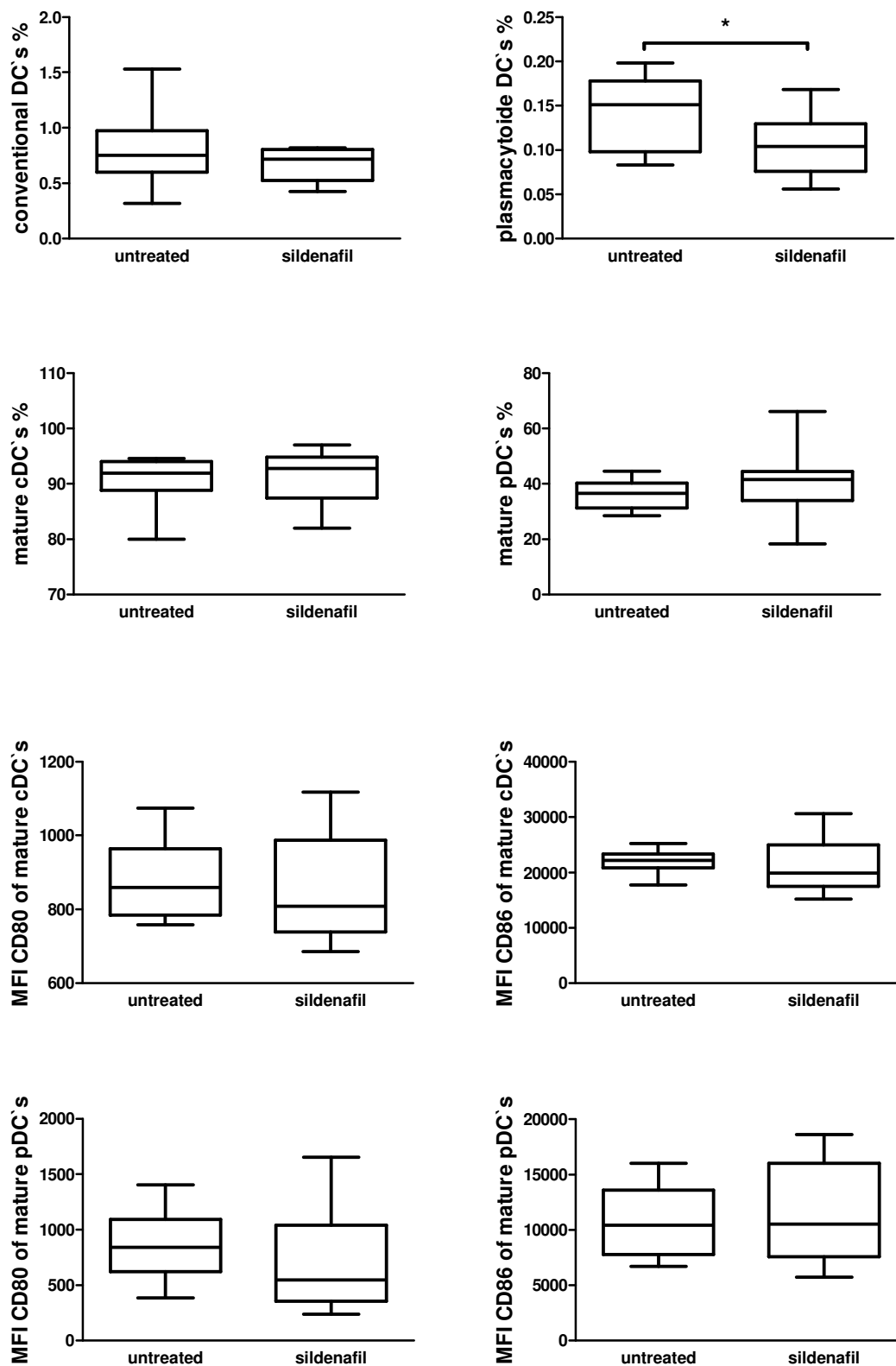


Abb.3.2.12. Quantifizierung von dendritischen Zellen in Primärtumoren tumortragender Mäuse mit und ohne Sildenafilbehandlung. Einzelzellsuspensionen der Tumoren wurden mit spezifischen Antikörpern inkubiert, anschließend die Anzahl an cDC's und pDC's sowie die mittlere Fluoreszenzintensität (Mean fluorescence intensity, MFI) der Reifungsmarker CD80 und CD86 durchflusszytometrisch bestimmt und statistisch mittels unpaired *T*-test erfasst (SE, *n* = 12-14, **p*<0.05)

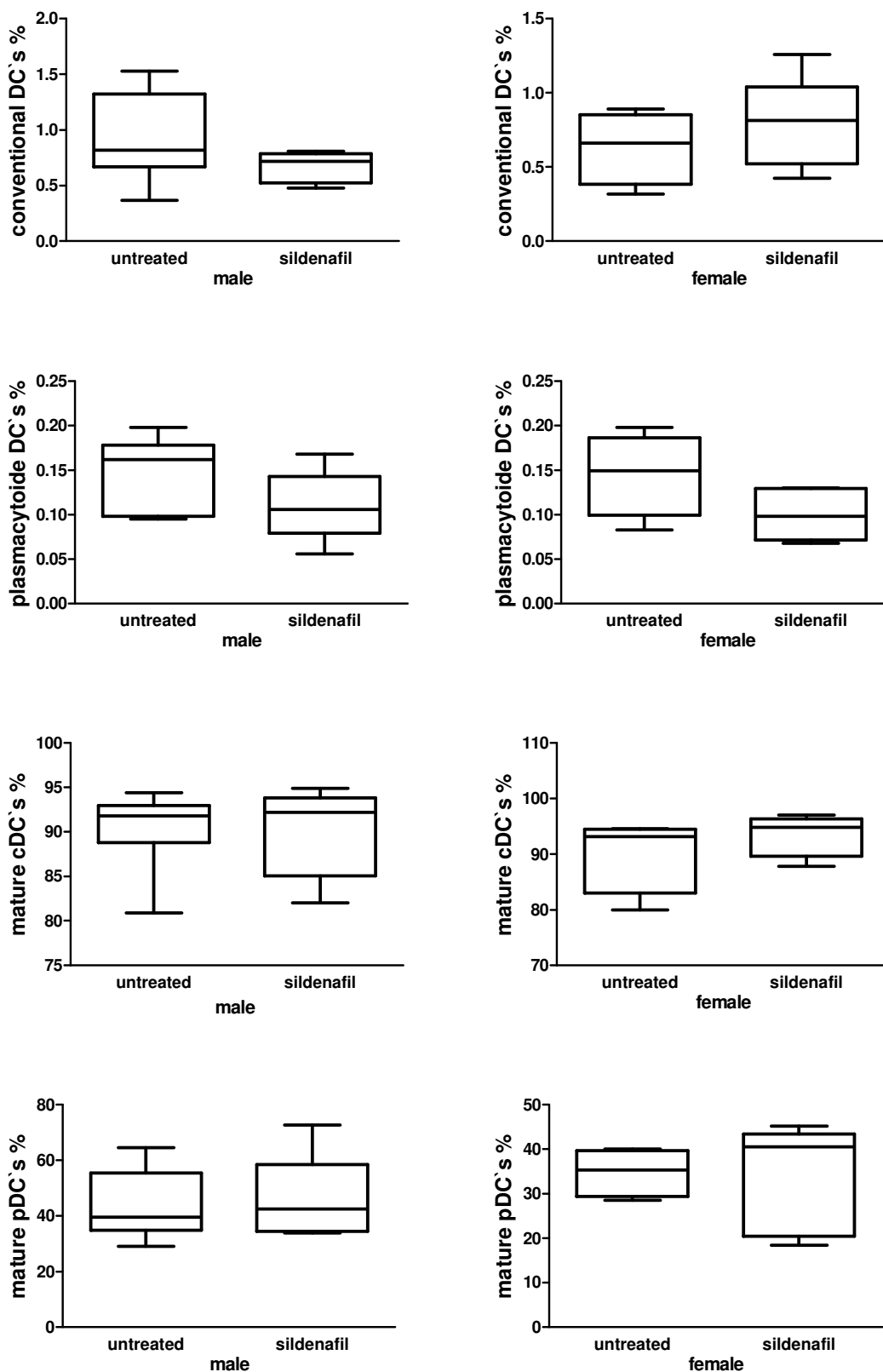


Abb.3.2.13. Quantifizierung von dendritischen Zellen in Primärtumoren tumortragender weiblicher und männlicher Mäuse mit und ohne Sildenafilbehandlung. Einzelzellsuspensionen der Tumoren wurden mit spezifischen Antikörpern inkubiert, anschließend die Anzahl an cDC's und pDC's durchflusszytometrisch bestimmt und statistisch mittels unpaired *T*-test erfasst (SE, n = 12-14)

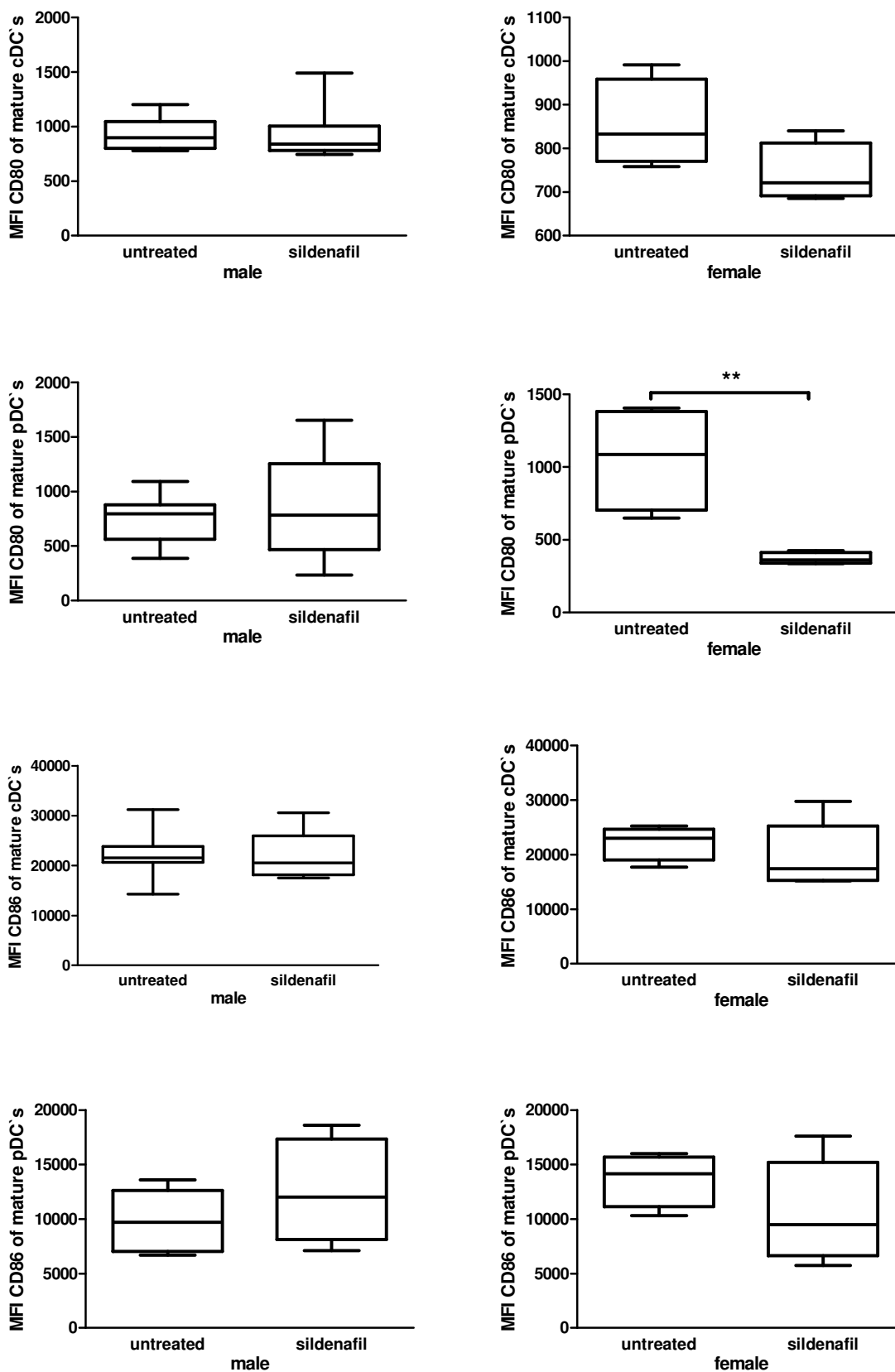


Abb.3.2.14. Bestimmung der mittleren Fluoreszenzintensität von dendritischen Zellen in Primärtumoren tumortragender weiblicher und männlicher Mäuse mit und ohne Sildenafilbehandlung. (unpaired *T*-test, SE, *n* = 12-14, ***p* < 0.01)

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die Behandlung mit Sildenafil bei den weiblichen Mäusen einen deutlich positiven Effekt auf die Überlebensrate hat. Diese signifikant verlängerte Überlebensrate steht mit der Reduzierung von MDSC im Primärtumorgewebe in engem Zusammenhang. Dies wird auch dadurch deutlich, da es beim männlichen Geschlecht zu keiner Reduzierung von MDSC im Primärtumor kommt und sich dies in einer schlechteren Überlebensrate widerspiegelt.

3.3. Phänotypische Charakterisierung von Leukozyten in gesunden Mäusen nach der Behandlung mit Sildenafil

Um Auswirkungen der Behandlung mit Sildenafil auf die Immunzellen im gesunden Organismus festzustellen, wurde Sildenafil den gesunden Mäusen über einen Zeitraum von 20 Tagen über das Trinkwasser verabreicht und anschließend Leukozyten aus der Milz mittels Durchflusszytometrie phänotypisch bestimmt. Eine zweite Gruppe der Mäuse wurde als Kontrollgruppe herangezogen. Abb. 3.3.1. zeigt die für die Milz verwendete Auswertestrategie am Beispiel der Bestimmung von $CD4^+$ T-Lymphozyten. Diese entspricht der Auswertestrategie bei tumortragenden Mäusen ohne vorherige Aussortierung von Tumorzellen durch den Marker CD45. Aus der gesamten gemessenen Zellpopulation wurde anhand der charakteristischen Parameter Größe "forward scatter" (FSC) gegen Granularität im "side scatter" (SSC) auf lebende lymphozytäre bzw. granulozytäre Zellen selektiert. Die Auswertestrategie für $CD8^+$ T-Zellen, T_{reg} , NK-/NK-T-Zellen, $Gr-1^+CD11b^+$ Zellen und dendritische Zellen erfolgte entsprechend.

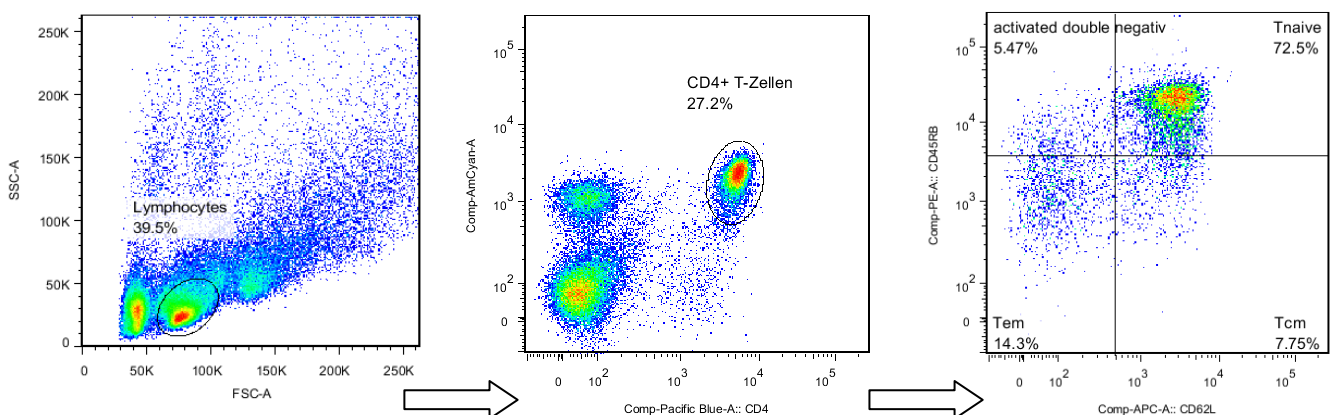


Abb.3.3.1. Auswertestrategie zur Bestimmung von $CD4^+$ T-Lymphozyten aus der Milz von gesunden Mäusen mittels FACS (Dotplot). Anhand der FSC vs. SSC-Darstellung wurde auf lebende Lymphozyten selektiert. Danach folgte die weitere Einteilung in $CD4^+$ T-Zellen sowie deren Subpopulationen: naive T-Zellen (T_{naive}), effector memory T-Zellen (T_{em}), central memory T-Zellen (T_{cm}).

Der Anteil an CD4⁺ und CD8⁺ T-Lymphozyten ist allgemein betrachtet unter Sildenafilbehandlung nicht stark verändert. Es besteht lediglich ein signifikanter Anstieg von naiven CD4⁺ T-Zellen (Abb. 3.3.2.).

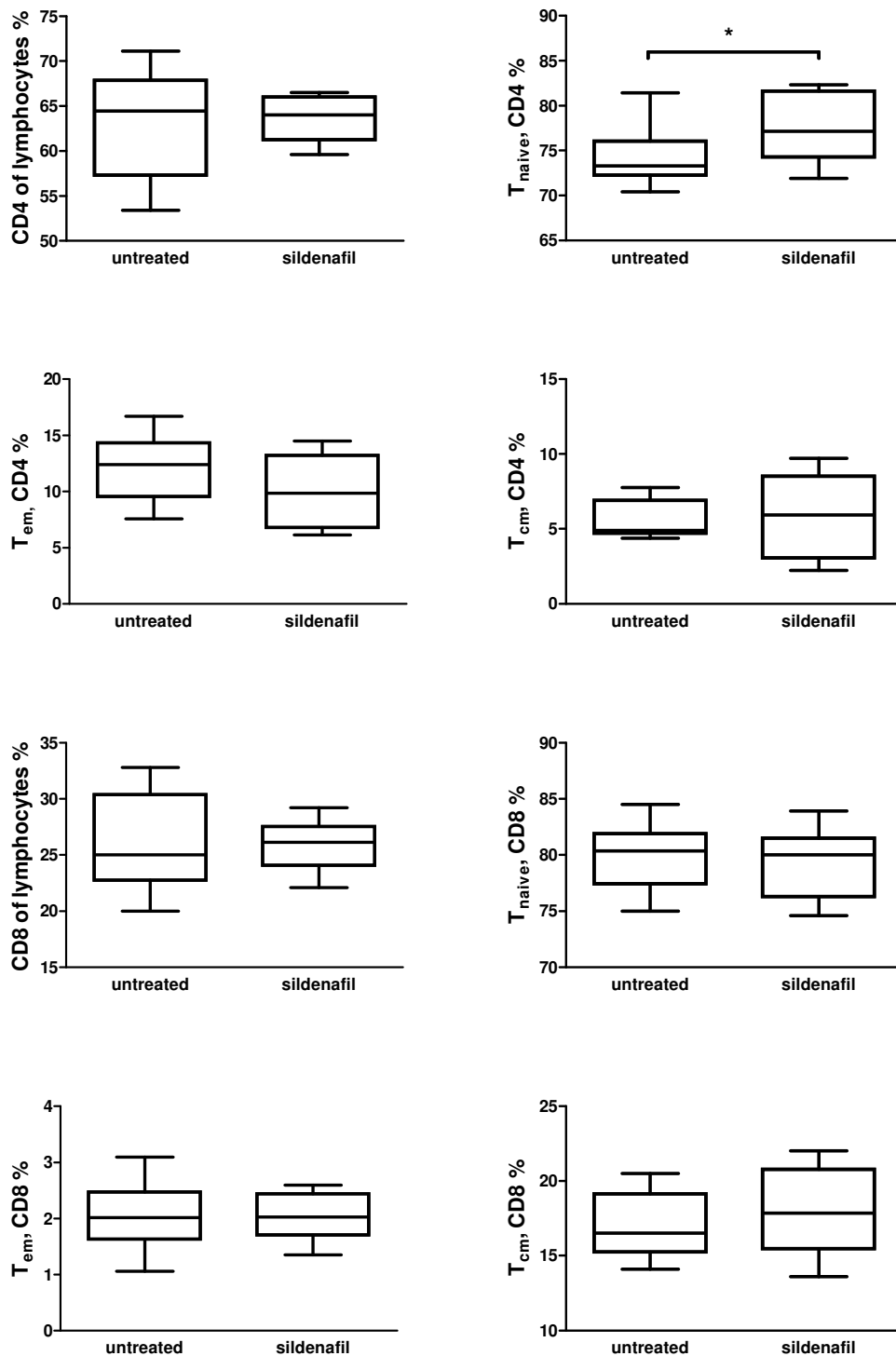


Abb.3.3.2. Quantifizierung der Lymphozytenpopulationen aus der Milz gesunder Mäuse mit und ohne Sildenafilbehandlung mittels FACS. Einzelzellsuspensionen aus Milzen wurden mit spezifischen Antikörpern inkubiert, anschließend die Anzahl spezifischer T-Zell-Populationen durchflusszytometrisch bestimmt und statistisch mittels unpaired *T*-test erfasst (SE, n = 10 pro Gruppe, *p<0.05)

Wie bereits bei den Mäusen mit Pankreaskarzinom zu beobachten war, zeigen auch die Ergebnisse der Anzahl an T-Lymphozyten von gesunden Mäusen einen deutlichen Unterschied zwischen Männchen und Weibchen. So ist die Anzahl an $CD4^+$ T-Zellen, T_{em} und T_{cm} bei den gesunden Männchen signifikant erniedrigt (Abb. 3.3.3.), die Anzahl an naiven $CD4^+$ T-Zellen jedoch signifikant erhöht (Abb. 3.3.3. *** $p<0.001$). Bei den gesunden Weibchen ist dies genau umgekehrt der Fall. So kommt es zu einem signifikanten Anstieg an T_{cm} (Abb. 3.3.3. *** $p<0.001$) und zu einem leichten Anstieg an $CD4^+$ T-Zellen und T_{em} (Abb. 3.3.3.).

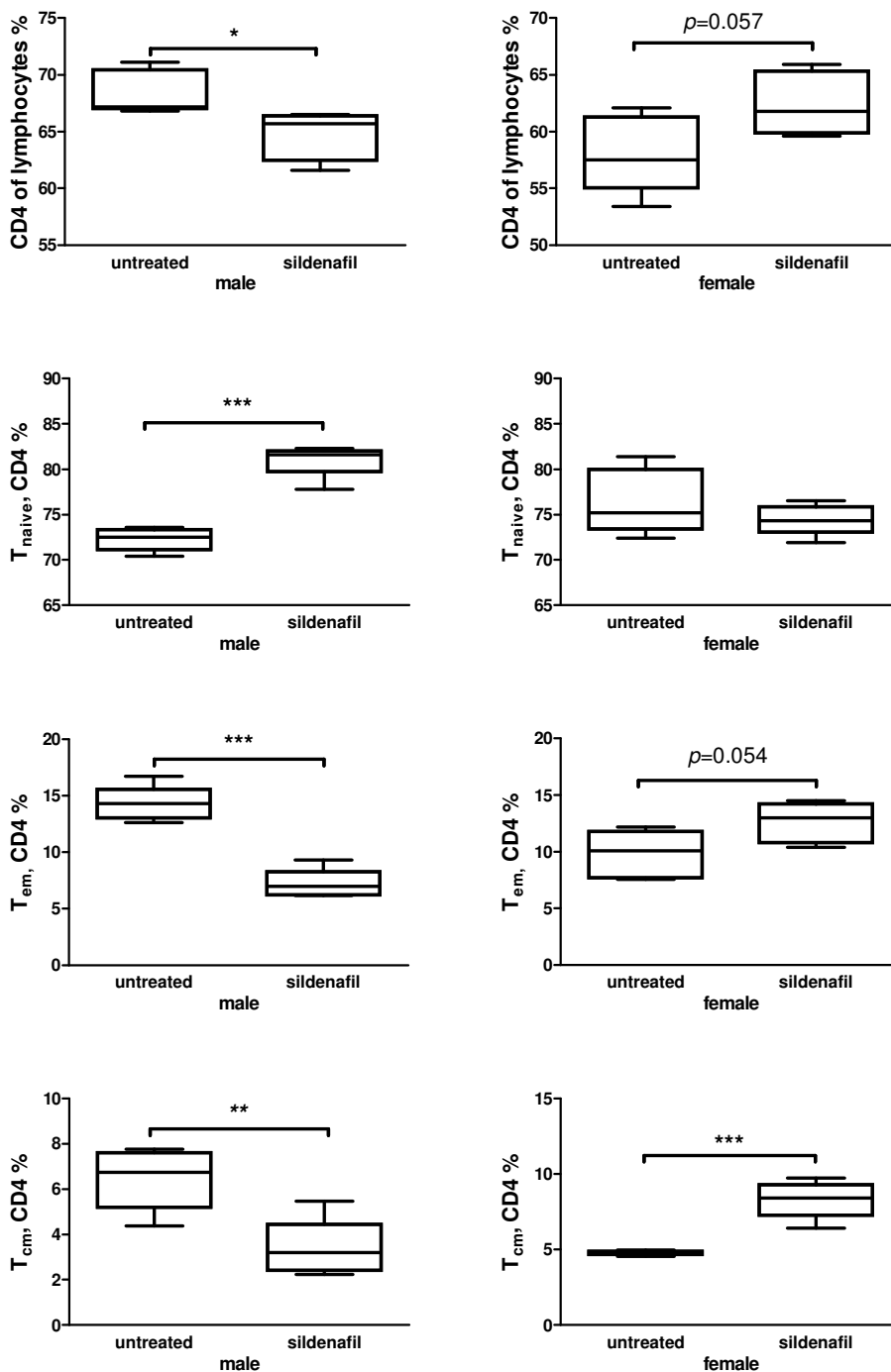


Abb.3.3.3.
Quantifizierung von $CD4^+$ T-Zellen und deren Subpopulationen aus der Milz gesunder weiblicher und männlicher Mäuse mit und ohne Sildenafilbehandlung

Einzelzellsuspensionen aus Milzen wurden mit spezifischen Antikörpern inkubiert, anschließend $CD4^+$ T-Zellen bestimmt und statistisch mittels unpaired T-test erfasst (SE, n = 5 pro Gruppe, * $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$)

Betrachtet man die Anzahl an $CD8^+$ T-Zellen bei den männlichen und weiblichen Tieren ist die gleiche Tendenz wie bei den tumortragenden Mäusen zu beobachten. Demnach kommt es bei den Männchen zu einem leichten Anstieg an $CD8^+$ T-Zellen (Abb. 3.3.4.), bei den Weibchen eher zu einem Abfall an $CD8^+$ T-Zellen und einem leichten Anstieg an T_{cm} (Abb. 3.3.4.).

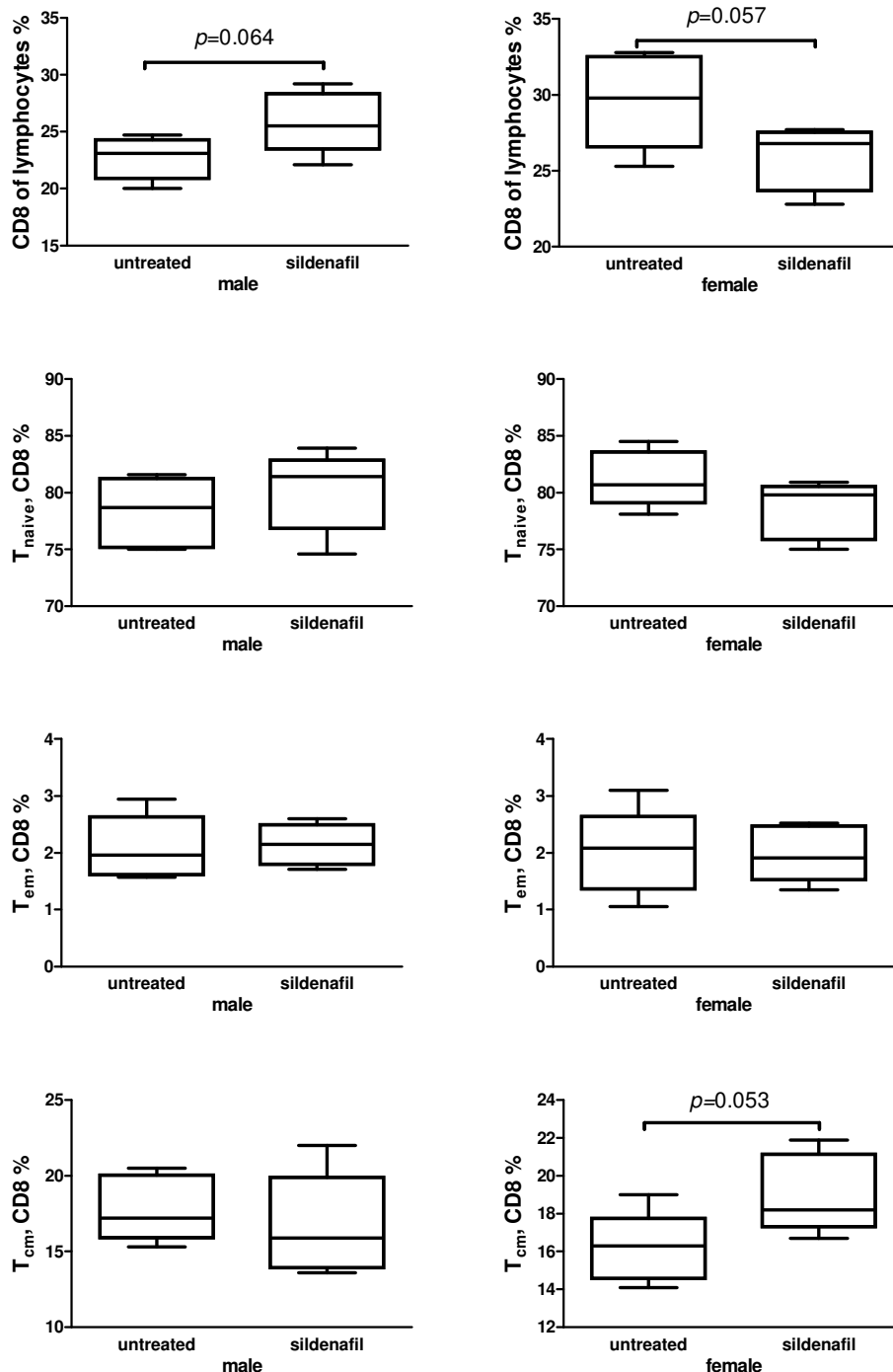


Abb.3.3.4. Quantifizierung von $CD8^+$ T-Zellen und deren Subpopulationen aus der Milz gesunder weiblicher und männlicher Mäuse mit und ohne Sildenafilbehandlung mittels FACS. Einzelzellsuspensionen aus Milzen wurden mit spezifischen Antikörpern inkubiert, anschließend $CD8^+$ T-Zellen durchflusszytometrisch bestimmt und statistisch mittels unpaired *T*-test erfasst (SE, n = 5 pro Gruppe)

Im nächsten Schritt wurden die Anzahl regulatorischer T-Zellen und deren Subpopulationen, sowie NK- und NK-T-Zellen gemessen. Die Ergebnisse sind in Abb. 3.3.5. und Abb. 3.3.6. dargestellt. Dabei ist im Allgemeinen ein signifikanter Anstieg an NK-Zellen zu sehen, der sich nach näheren Analysen jedoch nur auf die weibliche Population bezieht (Abb. 3.3.6.). Bei den männlichen Tieren kommt es hingegen zu einer signifikanten Reduzierung der Anzahl an NK-T-Zellen (Abb. 3.3.6.).

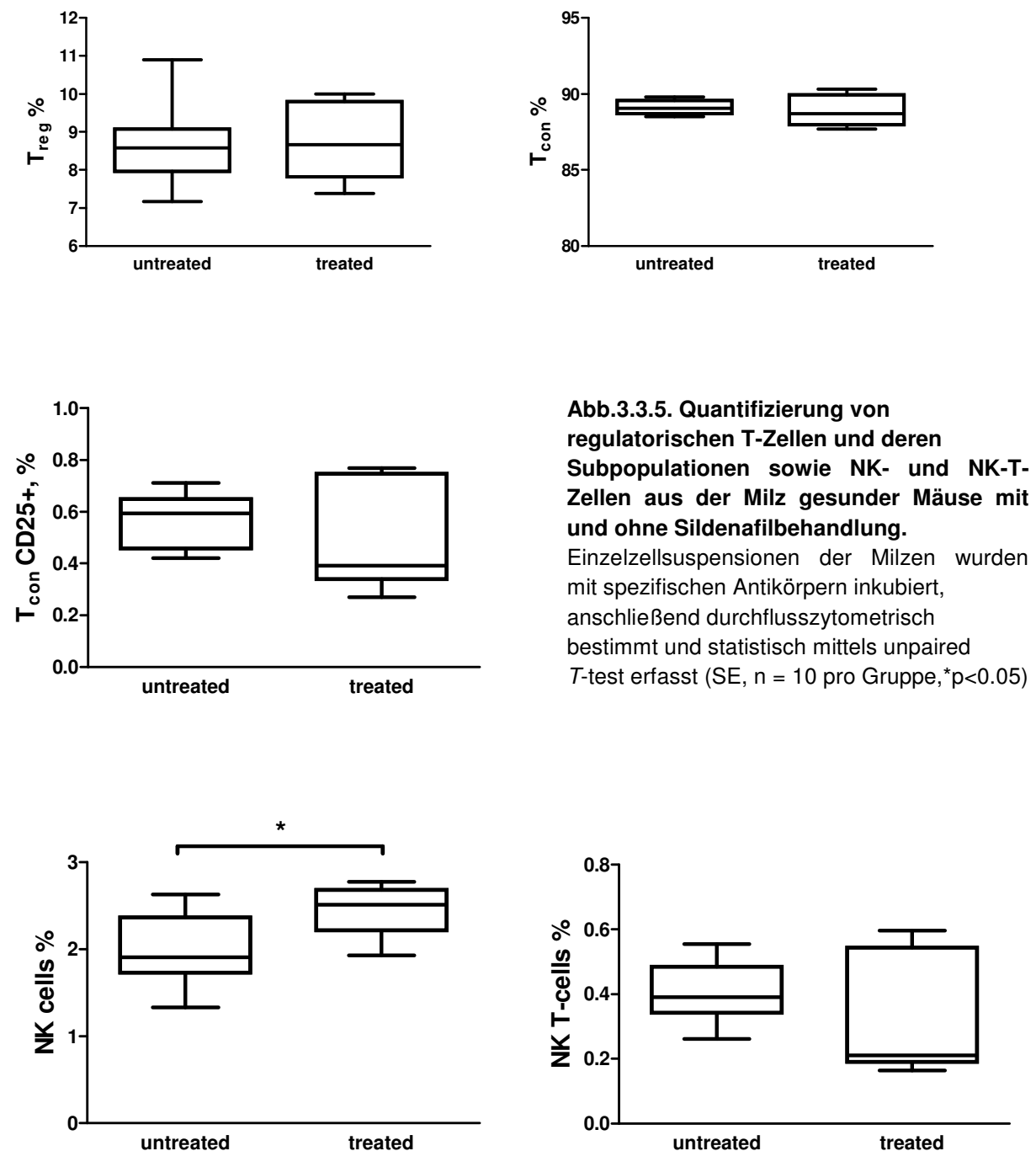


Abb.3.3.5. Quantifizierung von regulatorischen T-Zellen und deren Subpopulationen sowie NK- und NK-T-Zellen aus der Milz gesunder Mäuse mit und ohne Sildenafilbehandlung.

Einzelzellsuspensionen der Milzen wurden mit spezifischen Antikörpern inkubiert, anschließend durchflusszytometrisch bestimmt und statistisch mittels unpaired T-test erfasst (SE, n = 10 pro Gruppe, *p<0.05)

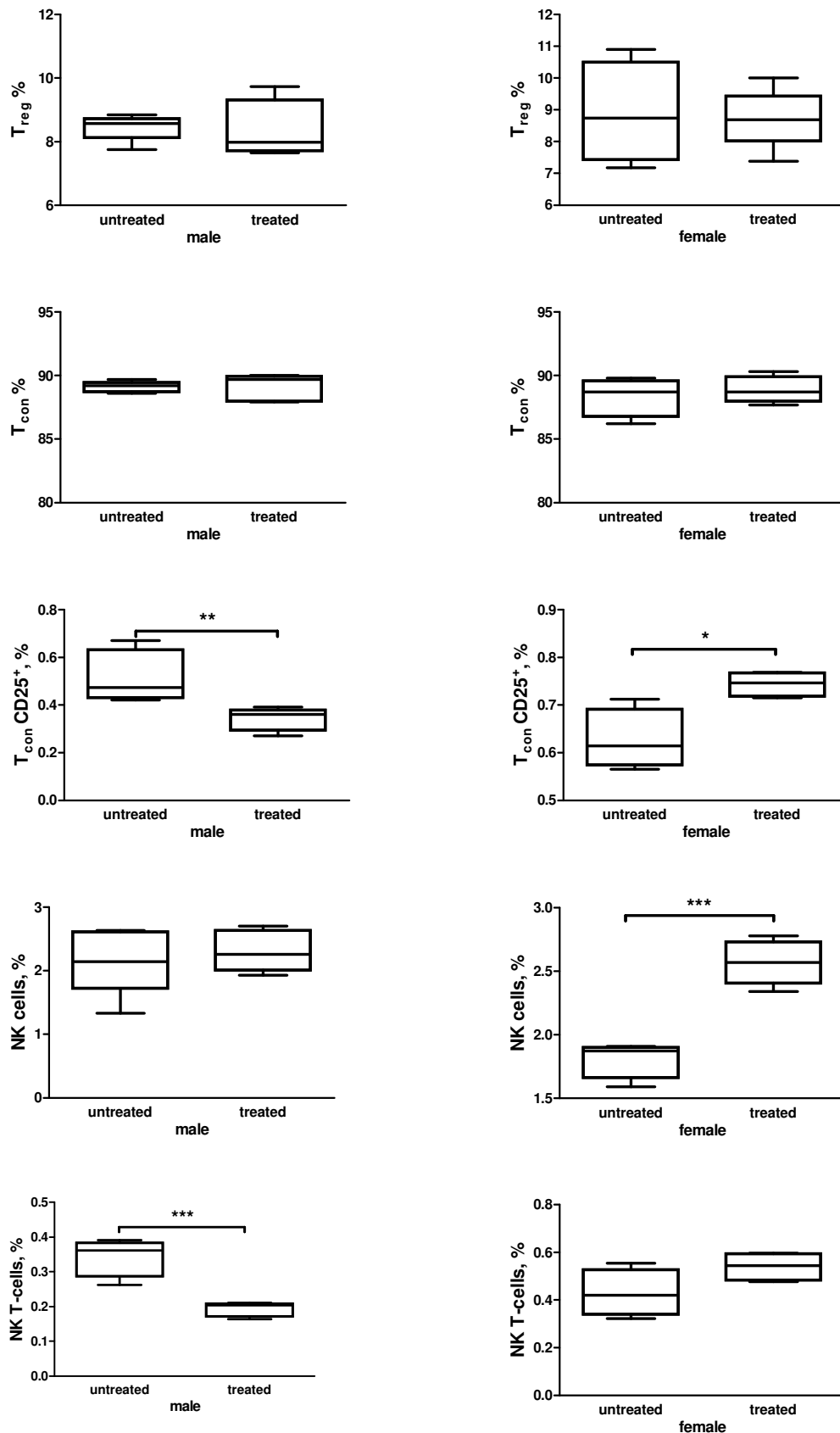


Abb.3.3.6. Quantifizierung von regulatorischen T-Zellen und deren Subpopulationen sowie NK- und NK-T-Zellen aus der Milz gesunder weiblicher und männlicher Mäuse mit und ohne Sildenafilbehandlung. Einzelzellsuspensionen der Milzen wurden mit spezifischen Antikörpern inkubiert, anschließend durchflusszytometrisch bestimmt und statistisch mittels unpaired *T*-test erfasst (SE, n = 5 pro Gruppe, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$)

Im Fokus unserer durchflusszytometrischen Analysen standen neben $CD4^+$ und $CD8^+$ T-Lymphozyten, regulatorischen T-Zellen und NK-/NK-T-Zellen auch $Gr-1^+CD11b^+$ Zellen. Betrachtet man die Ergebnisse in Abb. 3.3.7 ist auch hier wie bei den tumortragenden Mäusen ein signifikanter Abfall an $Gr-1^+CD11b^+$ Zellen im weiblichen Organismus festzustellen.

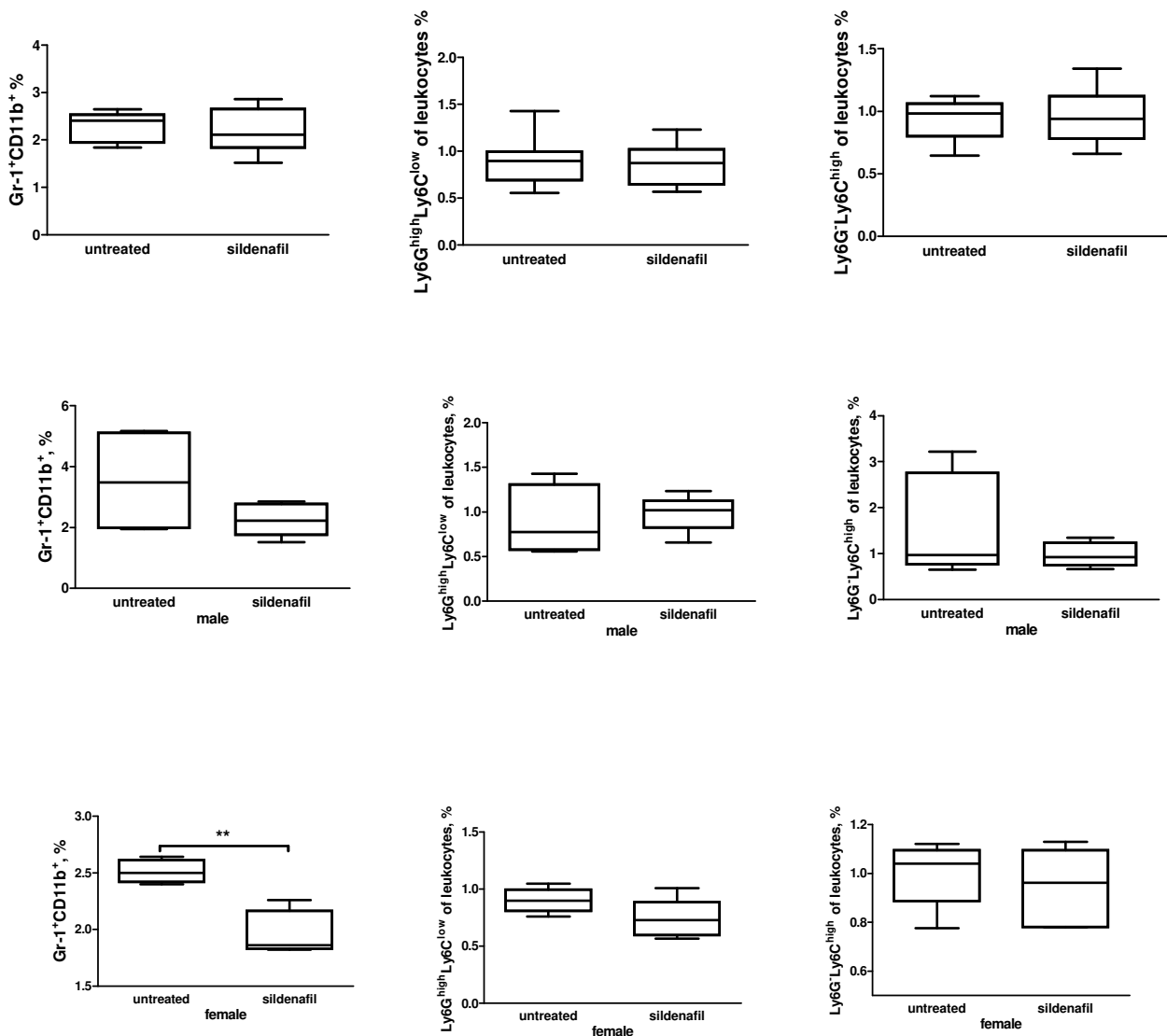


Abb.3.3.7. Quantifizierung von $Gr-1^+CD11b^+$ Zellen und deren Subpopulationen aus der Milz gesunder weiblicher und männlicher Mäuse mit und ohne Sildenafilbehandlung. Einzelzellsuspensionen der Milzen wurden mit spezifischen Antikörpern inkubiert, anschließend $Gr-1^+CD11b^+$ Zellen durchflusszytometrisch bestimmt und statistisch mittels unpaired *T*-test erfasst (SE, all animals $n = 10$ pro Gruppe; male/female $n = 5$ pro Gruppe, ** $p < 0.01$)

In Bezug auf die durchflusszytometrische Bestimmung von dendritischen Zellen brachte die Behandlung mit Sildenafil ebenso wie bei den tumortragenden Mäusen keine wesentlichen Veränderungen. Es konnte im weiblichen Organismus lediglich eine Herunterregulierung des Reifungsmarkers CD86 bei cDC`s und im männlichen Organismus eine Hochregulierung von CD86 bei pDC`s festgestellt werden (Abb. 3.3.10.).

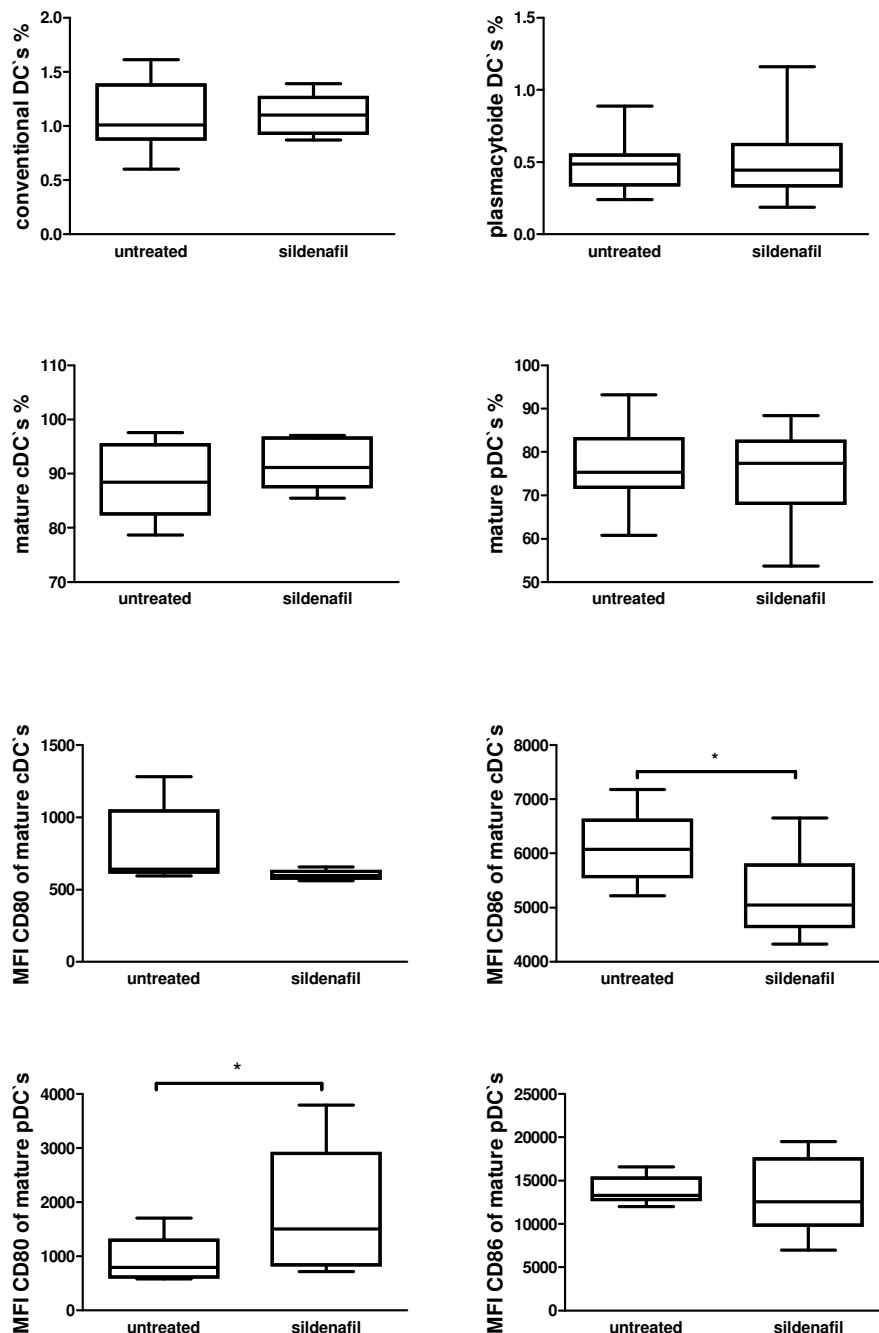


Abb.3.3.8. Quantifizierung von dendritischen Zellen aus der Milz gesunder Mäuse mit und ohne Sildenafilbehandlung. Einzelzellsuspensionen der Milzen wurden mit spezifischen Antikörpern inkubiert, anschließend die Anzahl an cDC`s und pDC`s sowie die mittlere Fluoreszenzintensität (Mean fluorescence intensity, MFI) der Reifungsmarker CD80 und CD86 durchflusszytometrisch bestimmt und statistisch mittels unpaired *T*-test erfasst (SE, n = 10 pro Gruppe, **p*<0.05)

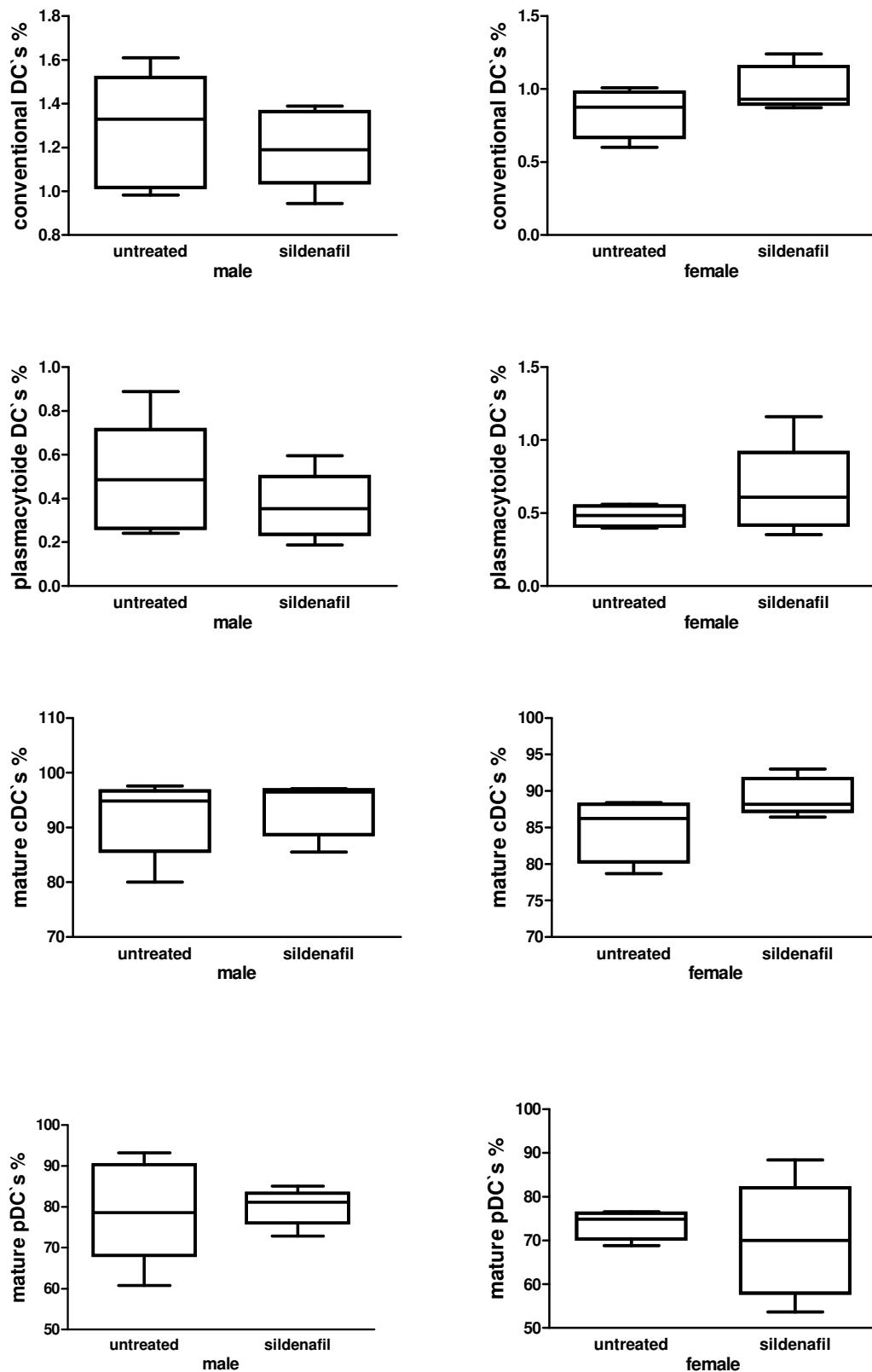


Abb.3.3.9. Quantifizierung von dendritischen Zellen aus der Milz gesunder weiblicher und männlicher Mäuse mit und ohne Sildenafilbehandlung. Einzelzellsuspensionen der Milzen wurden mit spezifischen Antikörpern inkubiert, anschließend die Anzahl an cDC's und pDC's durchflusszytometrisch bestimmt und statistisch mittels unpaired *T*-test erfasst (SE, n = 5 pro Gruppe)

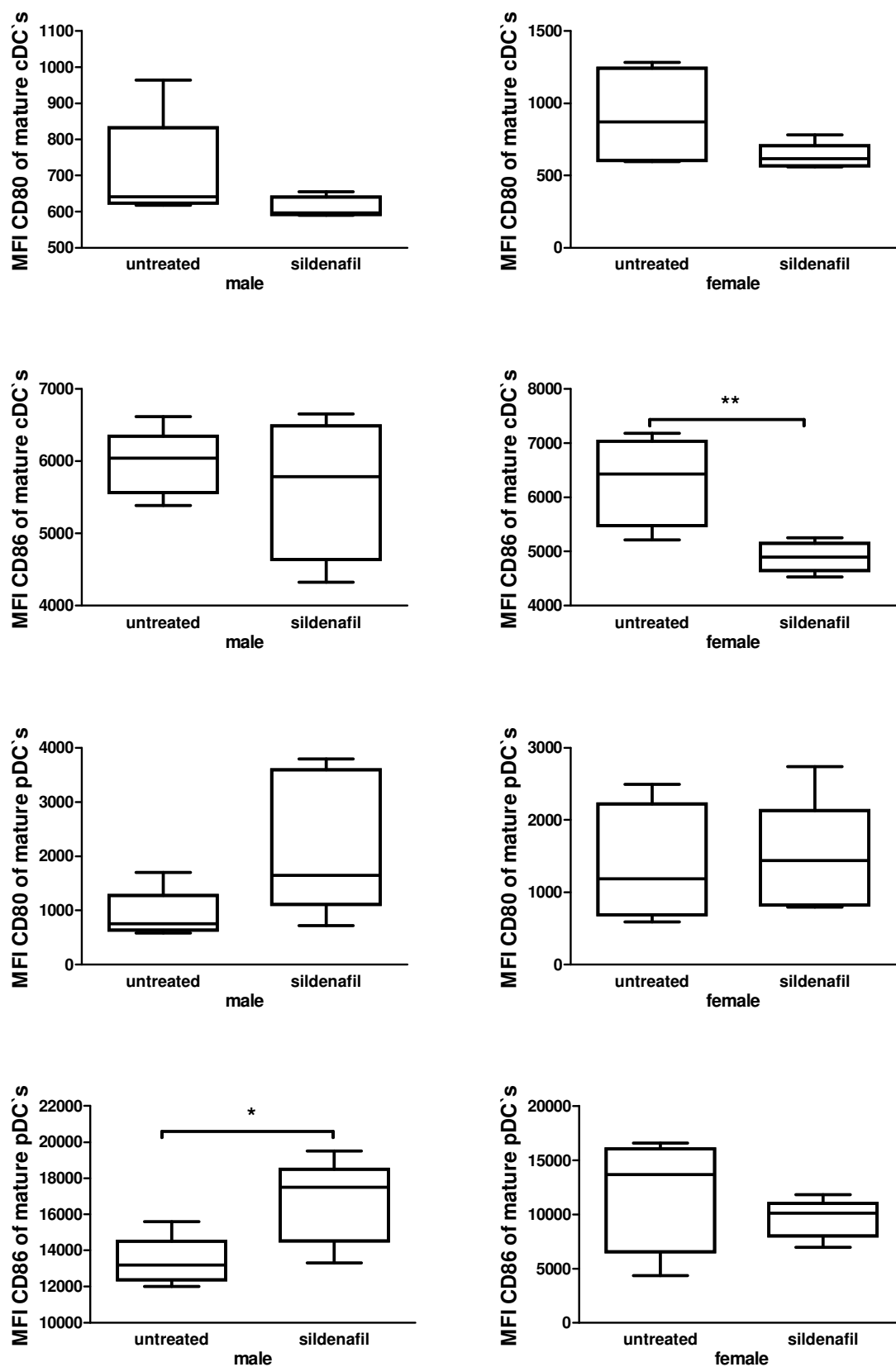


Abb.3.3.10. Bestimmung der mittleren Fluoreszenzintensität von dendritischen Zellen aus der Milz gesunder weiblicher und männlicher Mäuse mit und ohne Sildenafilbehandlung.
(unpaired *T*-test, SE, *n* = 5 pro Gruppe, **p*<0.05, ***p*<0.01)

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die Ergebnisse der Behandlung mit Sildenafil bei gesunden Mäusen ebenfalls geschlechtsabhängig sind. Dabei sind die wichtigsten Veränderungen in einem tendenziellen bzw. signifikanten Anstieg an $CD4^+$ T-Zellen und $CD4^+$ Gedächtniszellen beim weiblichen Tier und dagegen eine Reduzierung an $CD4^+$ T-Zellen und $CD4^+$ Gedächtniszellen beim männlichen Tier zu sehen. Auch die erhöhte Menge an NK-Zellen beim weiblichen Geschlecht und die Reduzierung der Anzahl an NK-T-Zellen beim Männchen sind weitere signifikante Ergebnisse. Desweiteren deckt sich das Ergebnis der Reduzierung von $Gr-1^+CD11b^+$ Zellen beim gesunden Weibchen mit dem Ergebnis bei den Weibchen mit Pankreaskarzinom. Somit kann festgehalten werden, dass Sildenafil sowohl im gesunden als auch im tumortragenden Organismus einen signifikanten Einfluss auf die Anzahl von MDSC bzw. $Gr-1^+CD11b^+$ Zellen hat und demzufolge eine wichtige Rolle in der immunologischen Behandlungstherapie des Pankreaskarzinoms spielen kann.

3.4. Analysen der Effekte von Sildenafil ex vivo

Um herauszufinden, ob Sildenafil einen direkten Einfluss auf Leukozyten hat, wurden diese aus peripherem Blut von gesunden Probanden isoliert, anschließend 24 Stunden *ex vivo* mit verschiedenen Sildenafilkonzentrationen (0 nM, 75 nM, 750 nM, 7.5 μ M) kultiviert und mittels FACS-Analysen phänotypisiert. Die Auswertestrategie zur Bestimmung von humanen T-Lymphozyten ist in Abb. 3.4.1. dargestellt. Aus der gesamten gemessenen Zellpopulation wurde anhand der charakteristischen Parameter Größe "forward scatter" (FSC) gegen Granularität im "side scatter" (SSC) auf lebende lymphozytäre Zellen selektiert. Zelltrümmer und Zellaggregate wurden dabei zusätzlich aussortiert. Alle lebenden Lymphozyten wurden anschließend in $CD4^+$ T-Zellen und $CD8^+$ T-Zellen eingeteilt mit anschließender Selektierung in deren Subpopulationen (naive T-Zellen, T_{em} , T_{cm}).

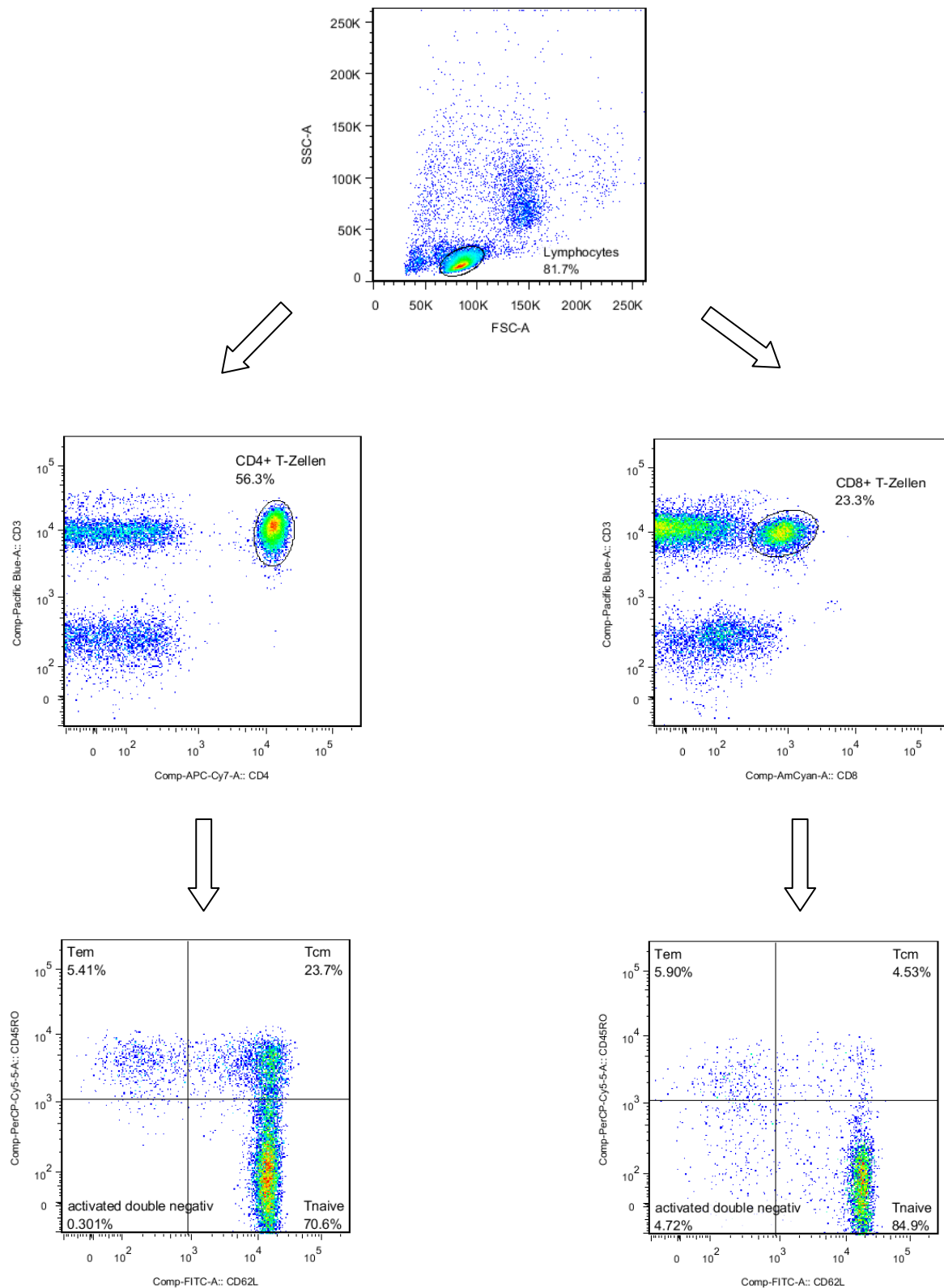


Abb.3.4.1. Auswertestrategie zur durchflusszytometrischen Bestimmung von T-Lymphozyten aus peripher Blut von gesunden Probanden nach Kultivierung mit Sildenafil (Dotplot). Anhand der FSC vs. SSC-Darstellung wurde auf lebende Lymphozyten selektiert. Danach folgte die weitere Einteilung in CD4⁺ T-Zellen und CD8⁺ T-Zellen sowie deren Subpopulationen: naive T-Zellen (T_{naive}), effector memory T-Zellen (T_{em}), central memory T-Zellen (T_{cm}).

Betrachtet man die Ergebnisse der Phänotypisierung von $CD4^+$ T-Zellen und $CD8^+$ T-Zellen sowie deren Subpopulationen so wird deutlich, dass die Kultivierung mit Sildenafil keinen Einfluss auf die Anzahl humaner T-Lymphozyten hat (Abb. 3.4.2. und Abb. 3.4.3.).

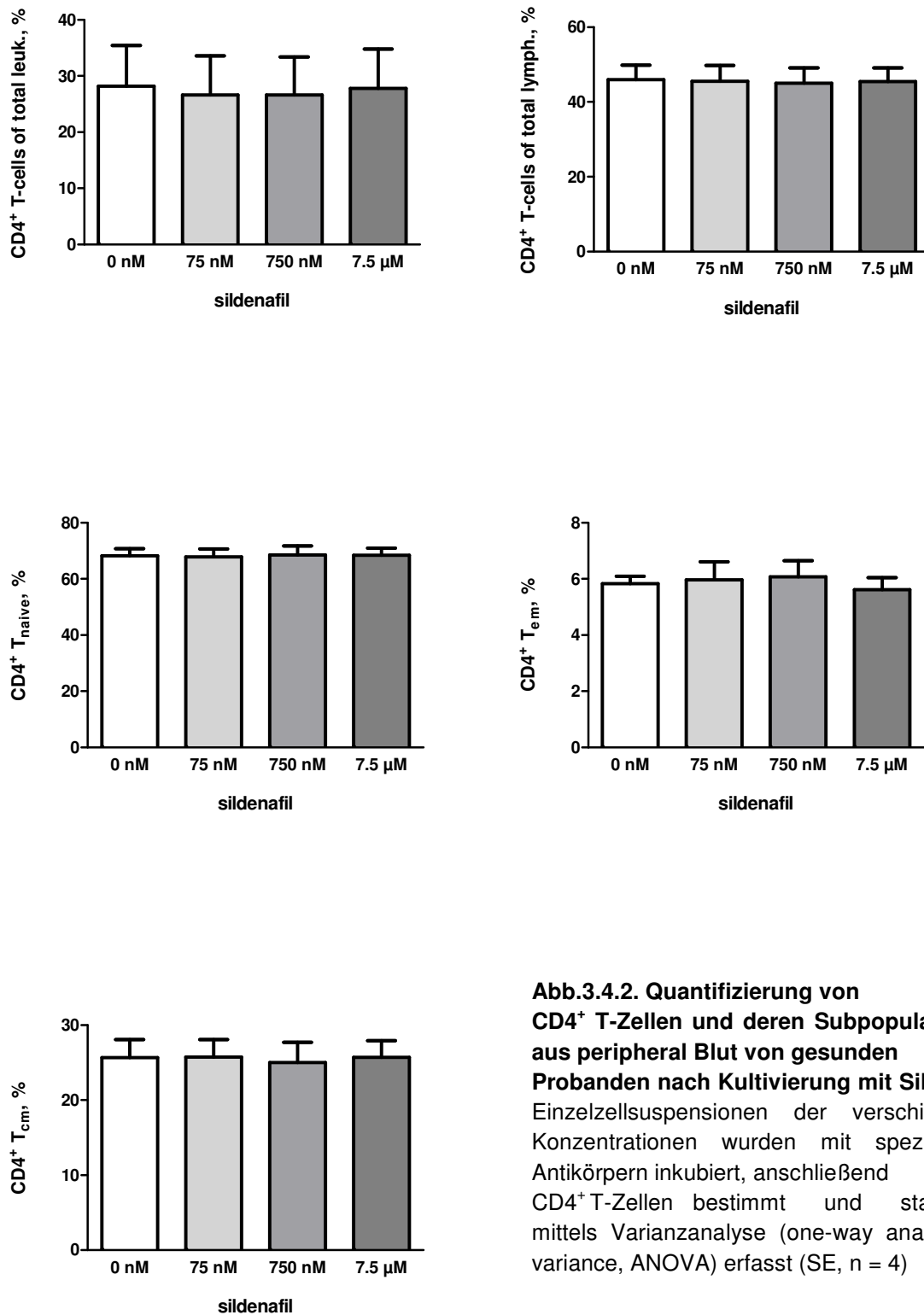


Abb.3.4.2. Quantifizierung von $CD4^+$ T-Zellen und deren Subpopulationen aus peripheral Blut von gesunden Probanden nach Kultivierung mit Sildenafil
Einzelzellsuspensionen der verschiedenen Konzentrationen wurden mit spezifischen Antikörpern inkubiert, anschließend $CD4^+$ T-Zellen bestimmt und statistisch mittels Varianzanalyse (one-way analysis of variance, ANOVA) erfasst (SE, n = 4)

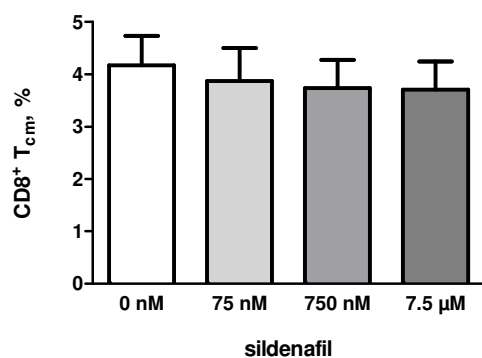
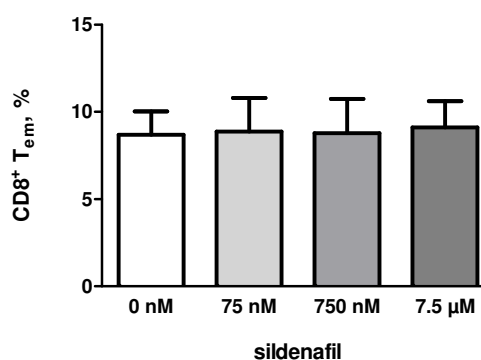
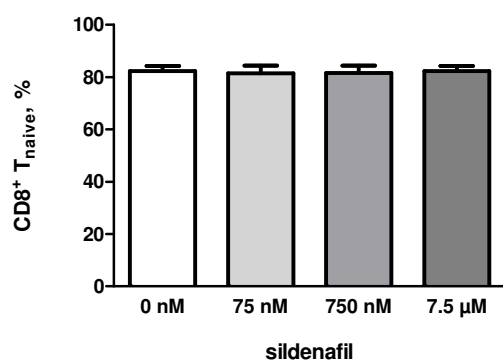
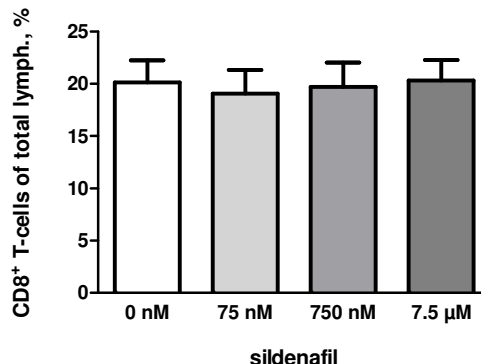
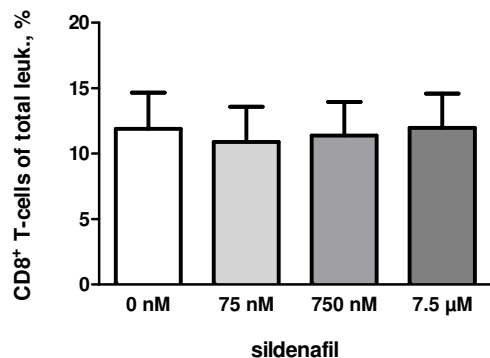


Abb.3.4.3. Quantifizierung von CD8⁺ T-Zellen und deren Subpopulationen aus peripheral Blut von gesunden Probanden nach Kultivierung mit Sildenafil
Einzelzellsuspensionen der verschiedenen Konzentrationen wurden mit spezifischen Antikörpern inkubiert, anschließend CD8⁺ T-Zellen bestimmt und statistisch mittels Varianzanalyse (one-way analysis of variance, ANOVA) erfasst (SE, n = 4)

Im nächsten Schritt wurden die Anzahl regulatorischer T-Zellen und deren Subpopulationen gemessen. Die Auswertestrategie hierfür ist in Abb. 3.4.4. dargestellt.

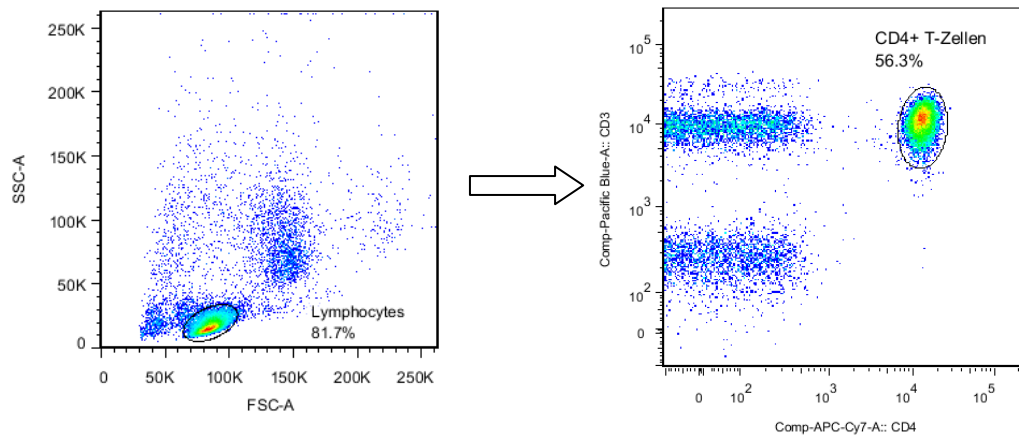


Abb.3.4.4.

Auswertestrategie zur Bestimmung von regulatorischen T-Zellen aus peripheral Blut von gesunden Probanden nach Kultivierung mit Sildenafil (Dotplot).

Anhand der FSC vs. SSC-Darstellung wurde auf lebende Lymphozyten selektiert, mit darauffolgender Einteilung in CD4⁺ T-Zellen und deren Subpopulationen T_{reg}, T_{con}, T_{con}CD25⁺. Anschließend erfolgte die jeweilige Unterteilung in naive und memory T-Zellen sowie die Quantifizierung von CD39⁺ und CD73⁺.

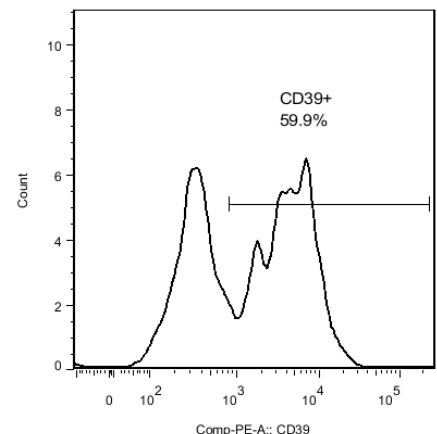
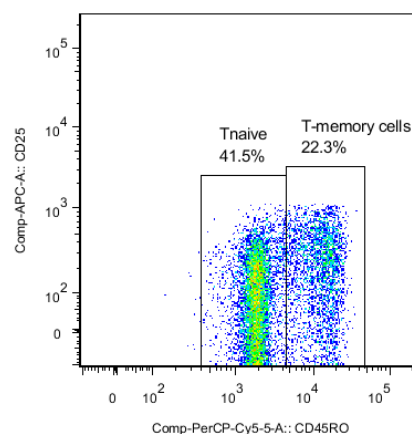
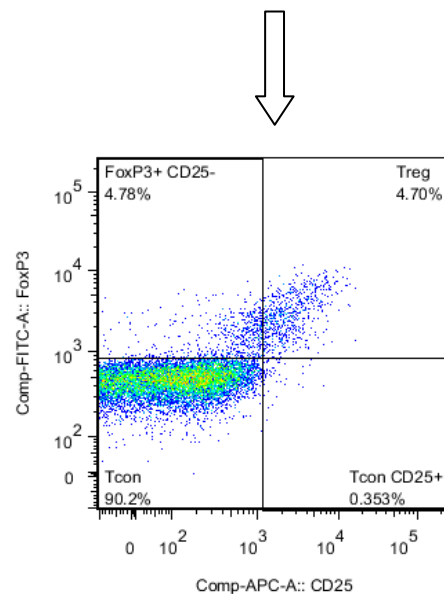


Abb. 3.4.5. und Abb. 3.4.6. fassen die gewonnenen Ergebnisse zusammen. Dabei ist ein signifikanter Einfluss auf naive und memory T_{regs} sowie auf T_{conCD25^+} zu sehen. Hierbei kommt es bei den beiden niedrigeren Sildenafilkonzentrationen (75 nM und 750 nM) zu einer Reduzierung der Anzahl an $T_{\text{naive}} T_{\text{regs}}$ und dagegen gleichzeitig zu einem Anstieg an $T_{\text{memory}} T_{\text{regs}}$ (Abb. 3.4.5.). Die Menge an T_{conCD25^+} Zellen ist ebenfalls bei beiden Konzentrationen herabgesetzt (Abb. 3.4.5.).

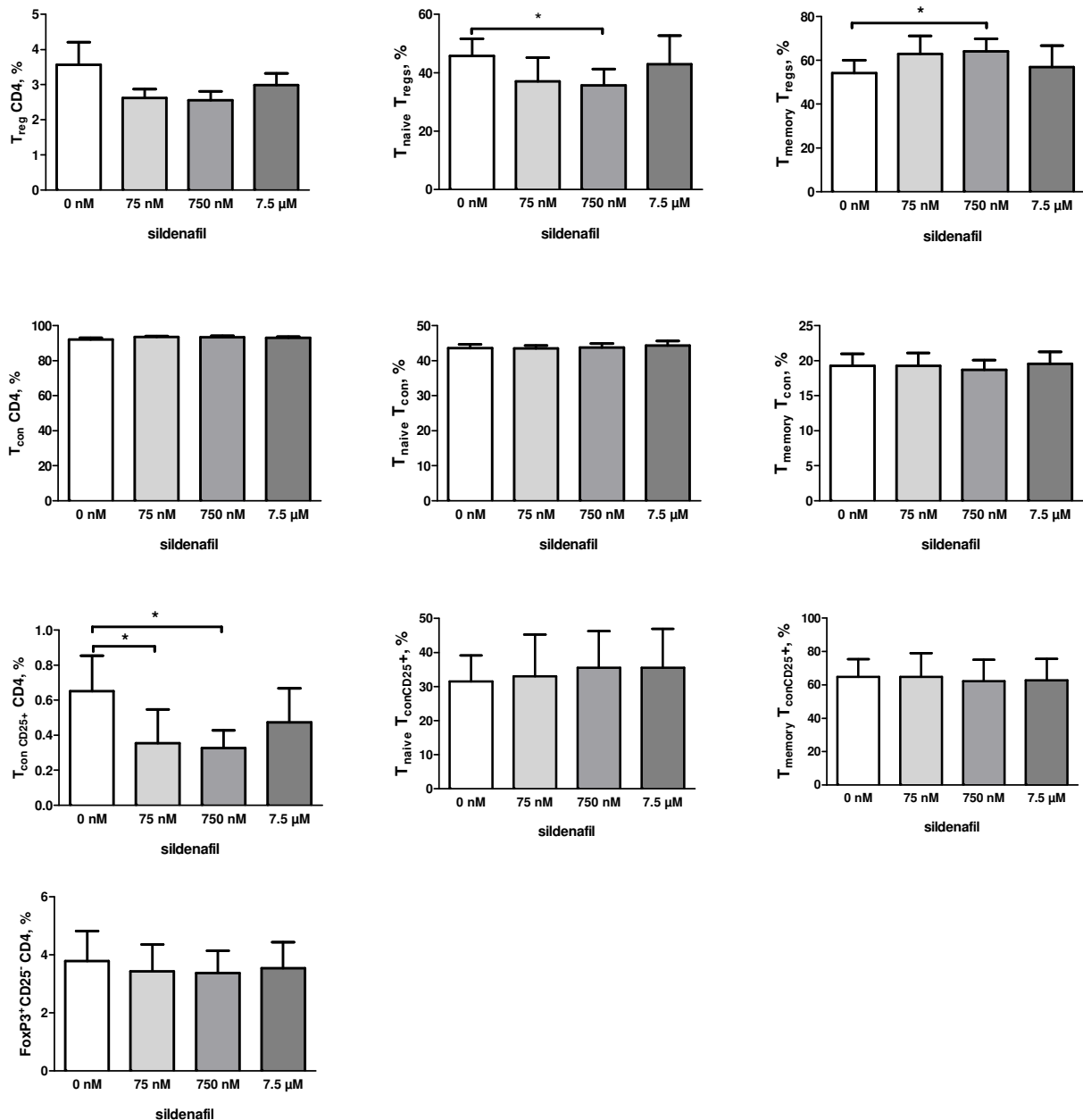


Abb.3.4.5. Quantifizierung von regulatorischen T-Zellen und deren Subpopulationen aus peripherem Blut von gesunden Probanden nach Kultivierung mit Sildenafil

Einzelzellsuspensionen der verschiedenen Konzentrationen wurden mit spezifischen Antikörpern inkubiert, anschließend regulatorische T-Zellen, T_{con} und T_{conCD25^+} bestimmt und statistisch mittels Varianzanalyse (one-way analysis of variance, ANOVA) erfasst (SE, n = 4, *p<0.05)

In Bezug auf die Marker CD39⁺ und CD73⁺ kann eine Herunterregulierung von CD73⁺ auf T_{con}, T_{con}CD25 und FoxP3⁺CD25⁻ Zellen festgestellt werden (Abb. 3.4.6.).

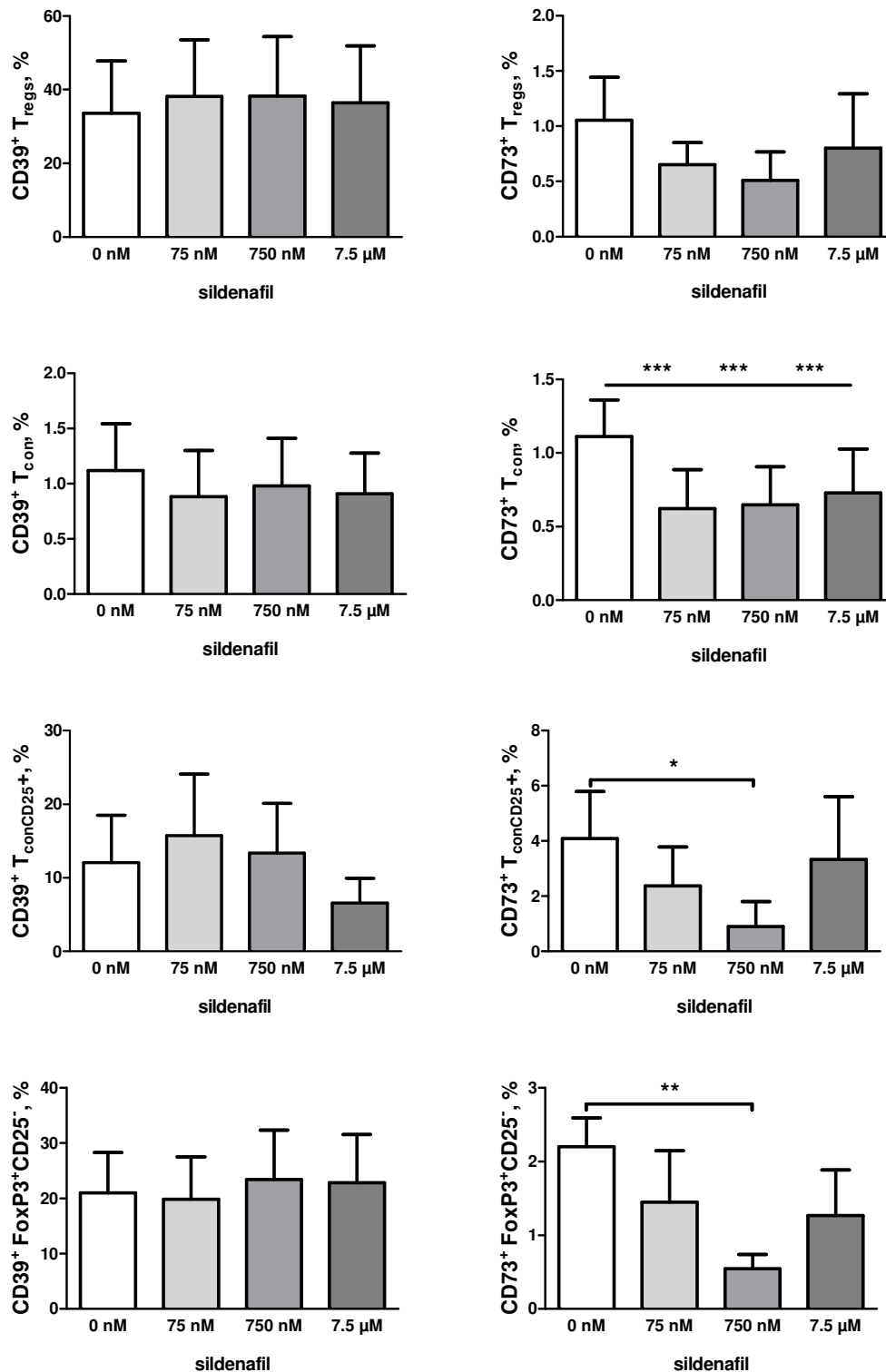


Abb.3.4.6. Quantifizierung von CD39⁺ und CD73⁺ auf regulatorischen T-Zellen und deren Subpopulationen aus peripheral Blut von gesunden Probanden nach Kultivierung mit Sildenafil (Varianzanalyse, one-way analysis of variance, ANOVA, SE, n = 4, *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001)

In Bezug auf die durchflusszytometrische Bestimmung der beiden Zellpopulationen $CD14^+HLA-DR^{low}$ und $CD14^+HLA-DR^-$ brachte die Kultivierung der Leukozyten mit Sildenafil keine Veränderungen (Abb. 3.4.8.). Die Auswertestrategie zur Bestimmung der beiden granulozytären und monozytären Zellpopulationen ist in Abb. 3.4.7. dargestellt.

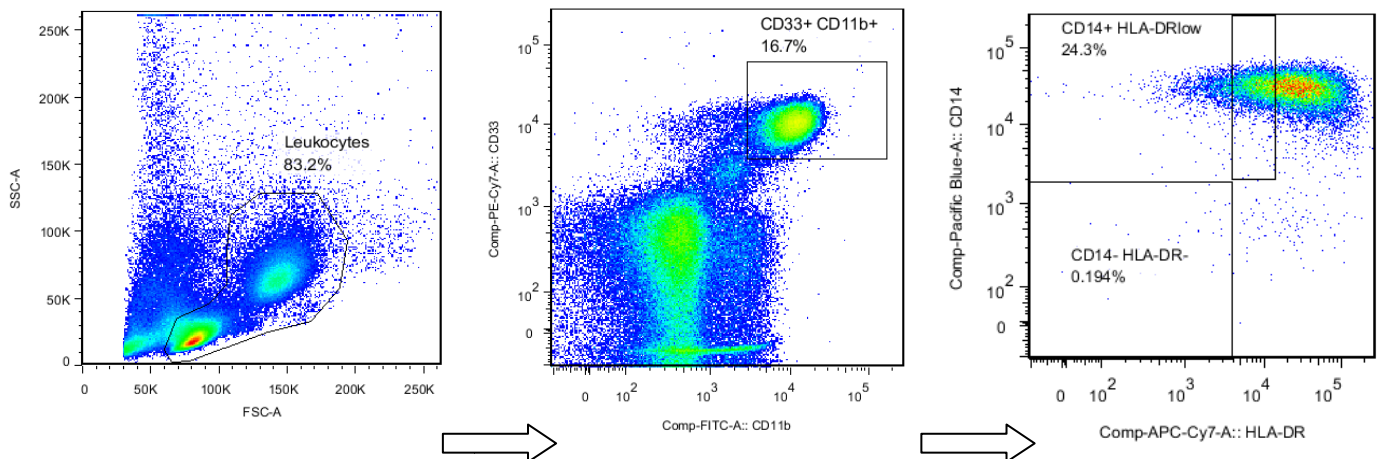


Abb.3.4.7. Auswertestrategie zur durchflusszytometrischen Bestimmung der beiden Zellpopulationen $CD14^+HLA-DR^{low}$ und $CD14^+HLA-DR^-$ aus peripheral Blut von gesunden Probanden nach Kultivierung mit Sildenafil (Dotplot). Anhand der FSC vs. SSC-Darstellung wurde auf lebende Leukozyten selektiert. Danach wurde der Anteil an $CD33^+CD11b^+$ Zellen sowie deren beide Subpopulationen ($CD14^+HLA-DR^{low}$ und $CD14^+HLA-DR^-$) bestimmt.

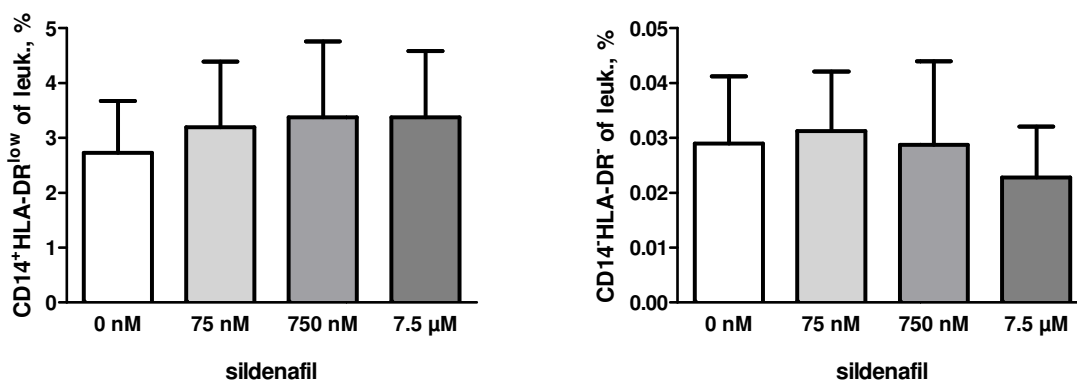


Abb.3.4.8. Quantifizierung der beiden Zellpopulationen $CD14^+HLA-DR^{low}$ und $CD14^+HLA-DR^-$ aus peripheral Blut von gesunden Probanden nach Kultivierung mit Sildenafil. Einzelzellsuspensionen der verschiedenen Konzentrationen wurden mit spezifischen Antikörpern inkubiert, anschließend durchflusszytometrisch bestimmt und statistisch mittels Varianzanalyse (one-way analysis of variance, ANOVA) erfasst (SE, n = 4)

Als letzte Gruppe in diesem Experiment wurden dendritische Zellen phänotypisch bestimmt. Abb. 3.4.9. stellt die hierfür verwendete Auswertestrategie dar.

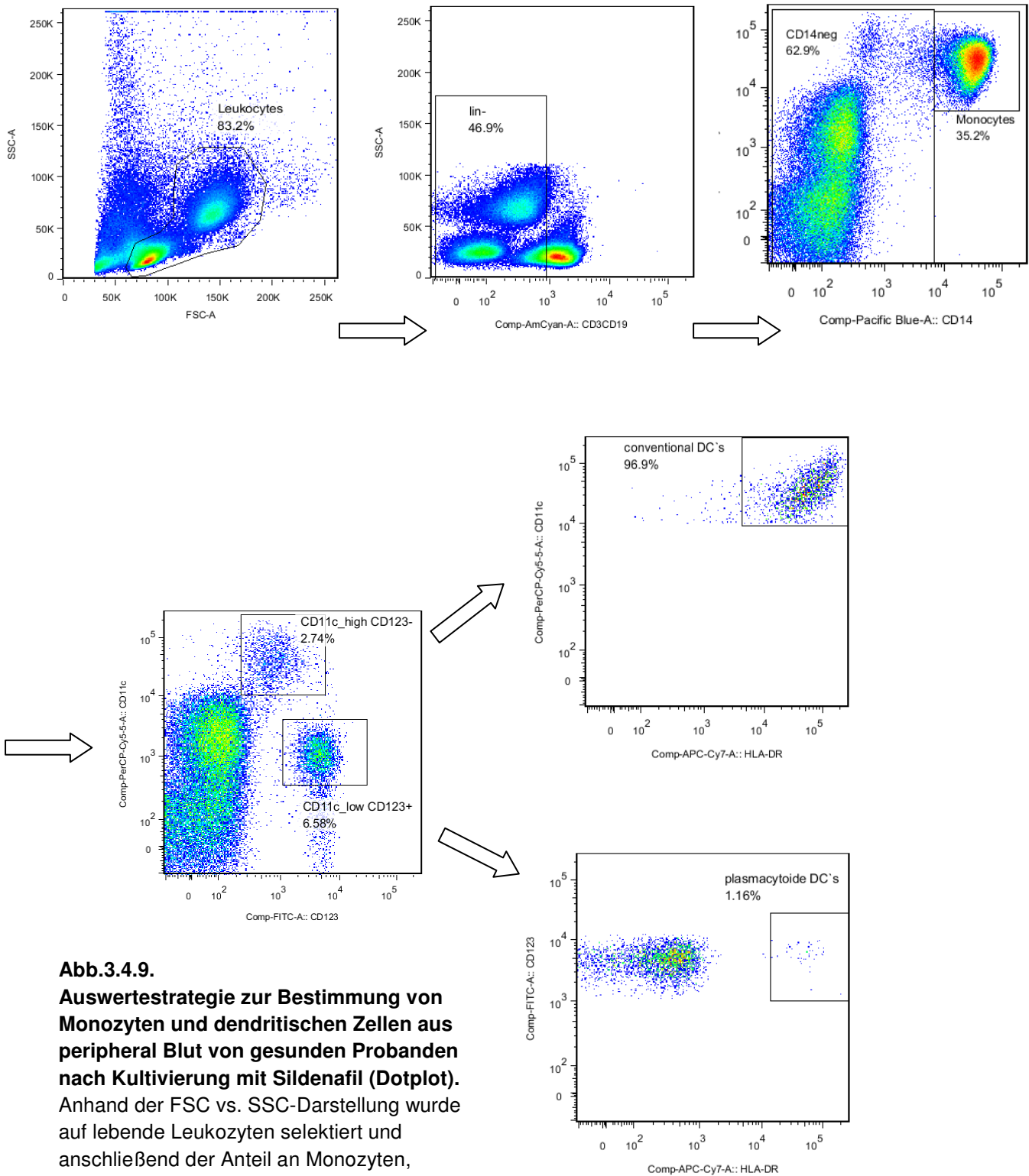


Abb.3.4.9.
Auswertestrategie zur Bestimmung von Monozyten und dendritischen Zellen aus peripheral Blut von gesunden Probanden nach Kultivierung mit Sildenafil (Dotplot).
Anhand der FSC vs. SSC-Darstellung wurde auf lebende Leukozyten selektiert und anschließend der Anteil an Monozyten, cDC's und pDC's bestimmt.

Betrachtet man die Ergebnisse in Abb. 3.4.10. ist ein leichter signifikanter Anstieg an cDC`s bei den beiden niedrigen Sildenafilkonzentrationen (75 nM und 750 nM) zu sehen (* $p < 0.05$). Da dieser Anstieg prozentual gesehen jedoch nur minimal ist, bleibt die Frage offen, ob mit dieser Veränderung auch eine physiologische (klinische) Relevanz einhergeht. Bezüglich der Anzahl an Monozyten, pDC`s und der Reifungsmarker CD80 und CD86 hatte Sildenafil keinen Einfluss (Abb. 3.4.10.).

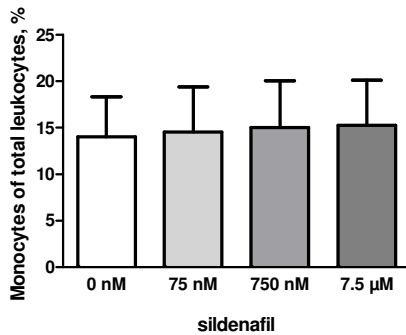
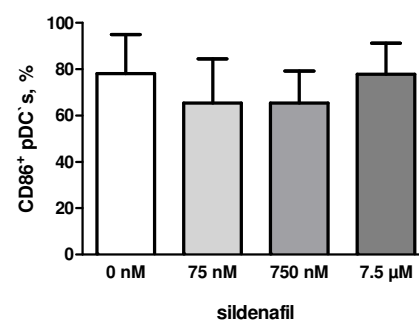
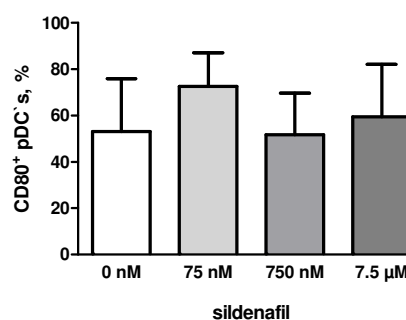
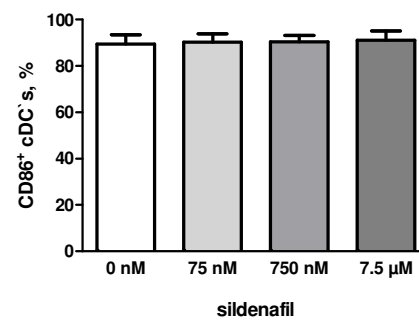
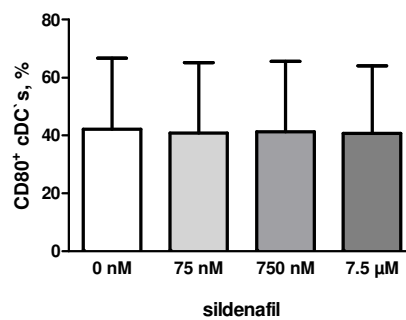
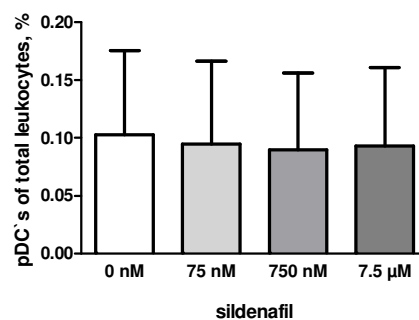
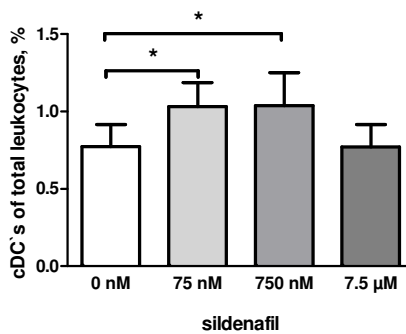


Abb.3.4.10.

Quantifizierung von Monozyten und dendritischen Zellen aus peripheral Blut von gesunden Probanden nach Kultivierung mit Sildenafil. Einzelzellsuspensionen der verschiedenen Konzentrationen wurden mit spezifischen Antikörpern inkubiert, anschließend die Anzahl an Monozyten, cDC`s und pDC`s durchflusszytometrisch bestimmt und statistisch mittels Varianzanalyse (one-way analysis of variance, ANOVA) erfasst (SE, $n = 4$, * $p < 0.05$)



Fasst man die gesamten Ergebnisse der Kultivierung von humanen Leukozyten mit Sildenafil zusammen, kommt man zu der Schlussfolgerung, dass Sildenafil im großen und ganzen keinen wesentlichen Einfluss auf humane Leukozyten von peripheralem Blut gesunder Probanden hat, aber trotzdem ein paar wenige Effekte auf dendritische Zellen, $T_{naive}T_{regs}$, $T_{memory}T_{regs}$, $T_{conCD25+}$ und Expression von $CD73^+$ ausübt.

3.5. Effekte der Kombination von Sildenafil und Chemotherapie (Gemcitabin) auf das Tumorwachstum, die Metastasierungsrate und das Überleben der tumortragenden Mäuse

In einem zweiten Versuch wurden die Mäuse mit einer Kombinationstherapie bestehend aus Sildenafil und Chemotherapie (Gem) behandelt. Dabei erfolgte die Sildenafilgabe (20mg/kg Körpergewicht) über das Trinkwasser ab dem 5. Tag post-op. Gem wurde den Mäusen an Tag 5, 9, 12, und 16 in einer Dosierung von 15mg/kg Körpergewicht i.p. injiziert. Dies entspricht $\frac{1}{10}$ der normalen therapeutischen Dosierung, um den Tumor nicht vollständig zu vernichten und somit die Effekte der Kombinationstherapie beurteilen zu können. Eine dritte Gruppe an Mäusen wurde als Kontrollgruppe herangezogen.

3.5.1. Effekte auf das Überleben

Betrachtet man die Ergebnisse der Kombinationstherapie in Bezug auf das Überleben, so ist sowohl allgemein als auch getrenntgeschlechtlich kein signifikanter Anstieg der Überlebensrate zu sehen (Abb. 3.5.1.1.). Diese Tatsache kann in Zusammenhang mit der niedrigeren Dosierung von Gem stehen. Betrachtet man die nach Geschlecht getrennten Analysen jedoch etwas genauer ist bei beiden Geschlechtern die gleiche Tendenz wie beim ersten Versuch (nur Sildenafilbehandlung) zu erkennen. Demnach scheinen die Weibchen besser auf Gem zu reagieren, da sie auch hier eine Tendenz zur Verbesserung der Überlebensrate zeigen. Bei den Männchen ist auch hier eher eine Tendenz zur Verschlechterung zu erkennen (Abb. 3.5.1.1.). Um diese Hypothese zu bestärken sind jedoch weitere Versuche mit höherer Dosierung von Gem ($\frac{1}{5}$) in Kombination mit Sildenafil nötig.

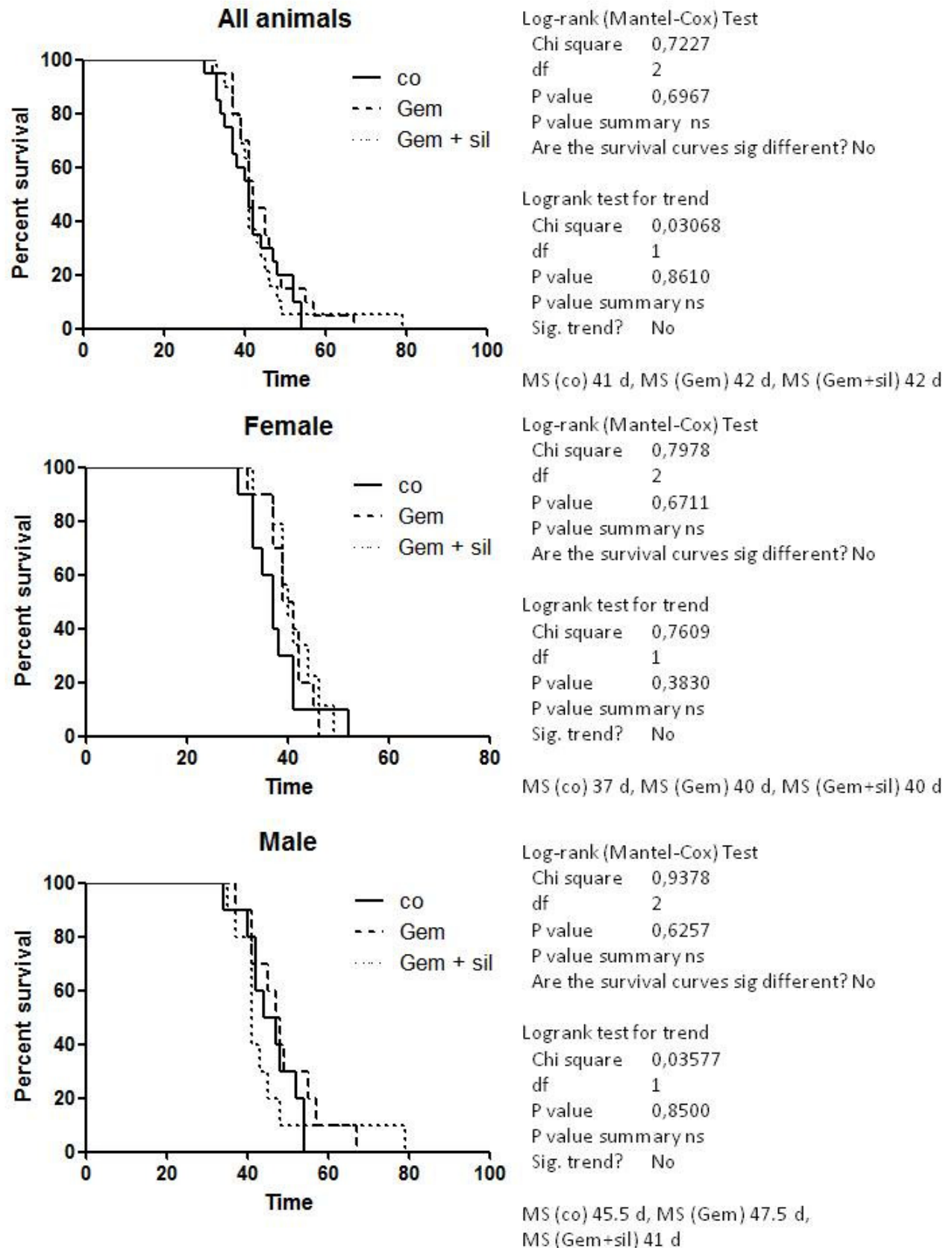


Abb.3.5.1.1. Effekte der Behandlung mit Sildenafil und Gem auf das Überleben der Mäuse mit Pankreaskarzinom. Mäuse wurden ab dem 5. Tag post-op über das Trinkwasser mit Sildenafil behandelt, Gem an Tag 5, 9, 12, und 16 i.p. injiziert und das Überleben statistisch mittels Kaplan-Meier Kurven erfasst. (all animals n = 20 pro Gruppe; female/male n = 10 pro Gruppe)

3.5.2. Effekte auf Tumervolumen und Tumorgröße

In Bezug auf das Tumervolumen können signifikante Veränderungen festgestellt werden. Die Ergebnisse sind in Abb. 3.5.2.1. dargestellt. Demnach kommt es unter der Kombinationsbehandlung zu einer deutlichen Reduzierung des Tumervolumens. Dieser Effekt ist auf die Wirkung von Gem zurückzuführen.

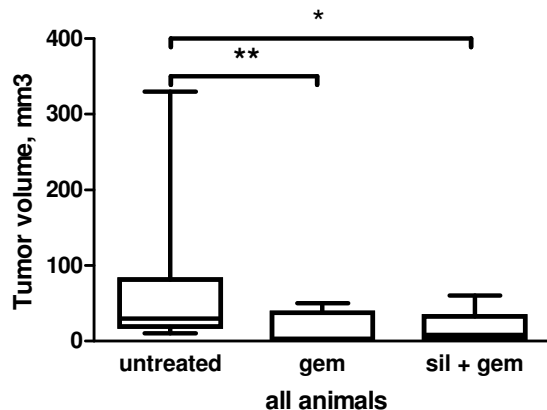
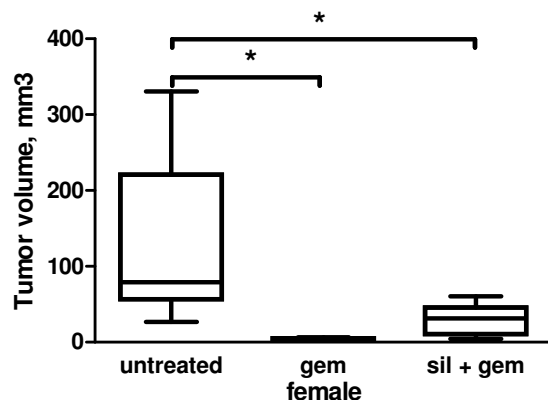
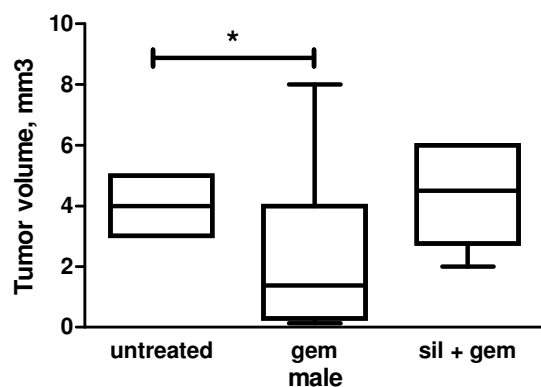
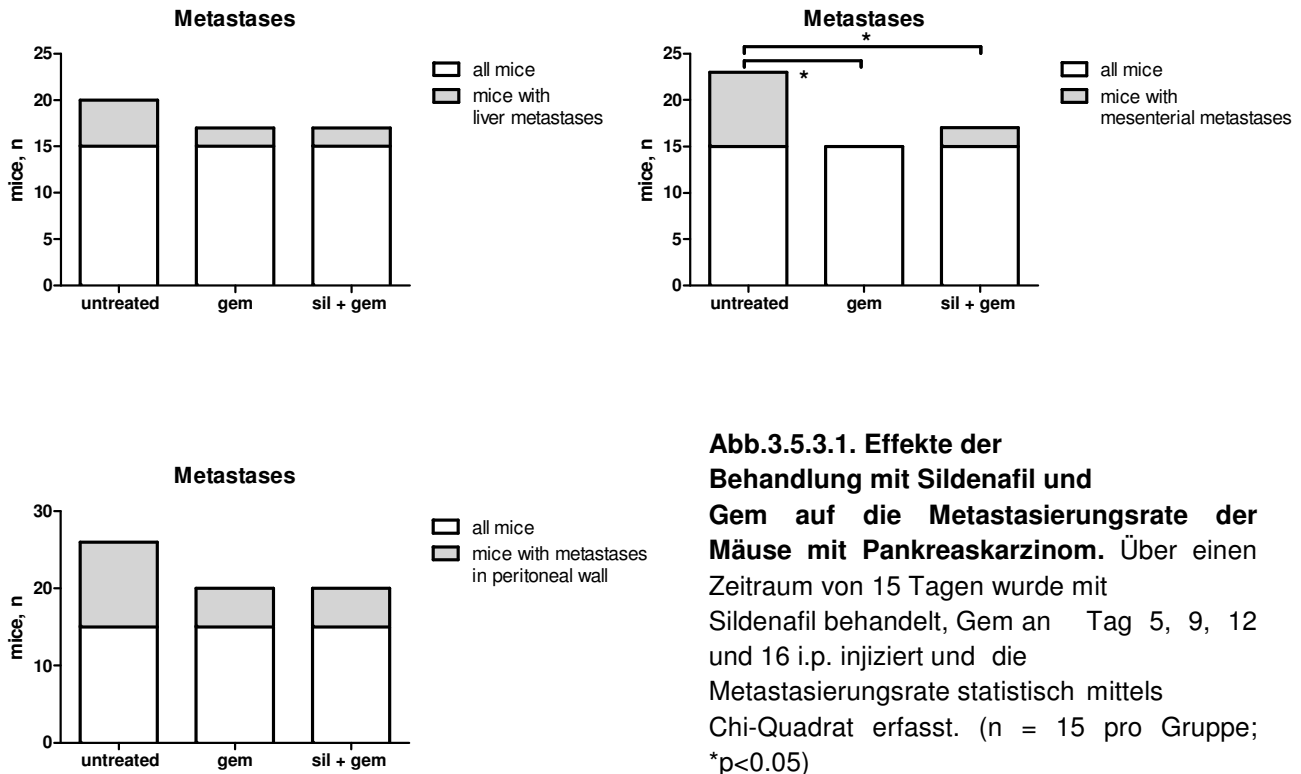


Abb.3.5.2.1. Effekte der Behandlung mit Sildenafil und Gem auf das Tumervolumen der Mäuse mit Pankreaskarzinom. Über einen Zeitraum von 15 Tagen wurde mit Sildenafil behandelt, Gem an Tag 5, 9, 12, und 16 i.p. injiziert und das Tumervolumen statistisch erfasst. (SE; all animals n = 15 pro Gruppe; female n = 8 pro Gruppe; male n = 7 pro Gruppe; *p<0.05, **p<0.01)



3.5.3. Effekte auf die Metastasierungsrate

Im Hinblick auf die Metastasierungsrate konnte eine Reduzierung der mesenterialen Metastasen sowohl bei der Behandlung mit Gem alleine als auch in Kombination mit Sildenafil erreicht werden (Abb. 3.5.3.1.). Bezüglich der Metastasierung in Leber und Peritonealwand sind zwar keine statistisch signifikanten Abweichungen zu beobachten, jedoch liegt der Trend auch hier in einer Reduzierung bei beiden Behandlungsschemata (Abb. 3.5.3.1.).



3.6. Phänotypische Charakterisierung von Leukozyten in Tumoren nach der kombinierten Behandlung

Als letzter Schritt wurden die Primärtumoren der Mäuse mit Kombinationsbehandlung auf Leukozyten phänotypisch untersucht. Dabei wurden Einzelzellsuspensionen der Tumoren hergestellt, mit den spezifischen Antikörpern inkubiert und durchflusszytometrisch bestimmt. Die Auswertestrategie der Phänotypisierung entspricht der Auswertestrategie der Mäuse mit Pankreaskarzinom nach alleiniger Sildenafilbehandlung (Abb. 3.2.1., Abb. 3.2.5., Abb. 3.2.8., Abb. 3.2.11.).

Der Anteil an CD4⁺ T-Lymphozyten ist allgemein betrachtet nicht signifikant verändert. Der Anteil an CD8⁺ T-Lymphozyten jedoch ist nach der kombinierten Behandlung mit Sildenafil und Gem signifikant erniedrigt (Abb. 3.6.1.). Zudem zeigen die gewonnenen Ergebnisse, dass Gem selbst einen Effekt auf T-Zellen ausübt. So kommt es sowohl bei CD4⁺ T-Zellen als auch bei CD8⁺ T-Zellen zu einem signifikanten Anstieg an naiven und central memory T-Zellen nach der Behandlung mit Gem und nach der kombinierten Behandlung mit Sildenafil (Abb. 3.6.1.).

Auf die Anzahl an effector memory T-Zellen hingegen konnte durch die Behandlung eine Reduzierung ausgeübt werden (Abb. 3.6.1.). Eine Aufteilung in getrenntgeschlechtliche Unterschiede konnte nicht beobachtet werden.

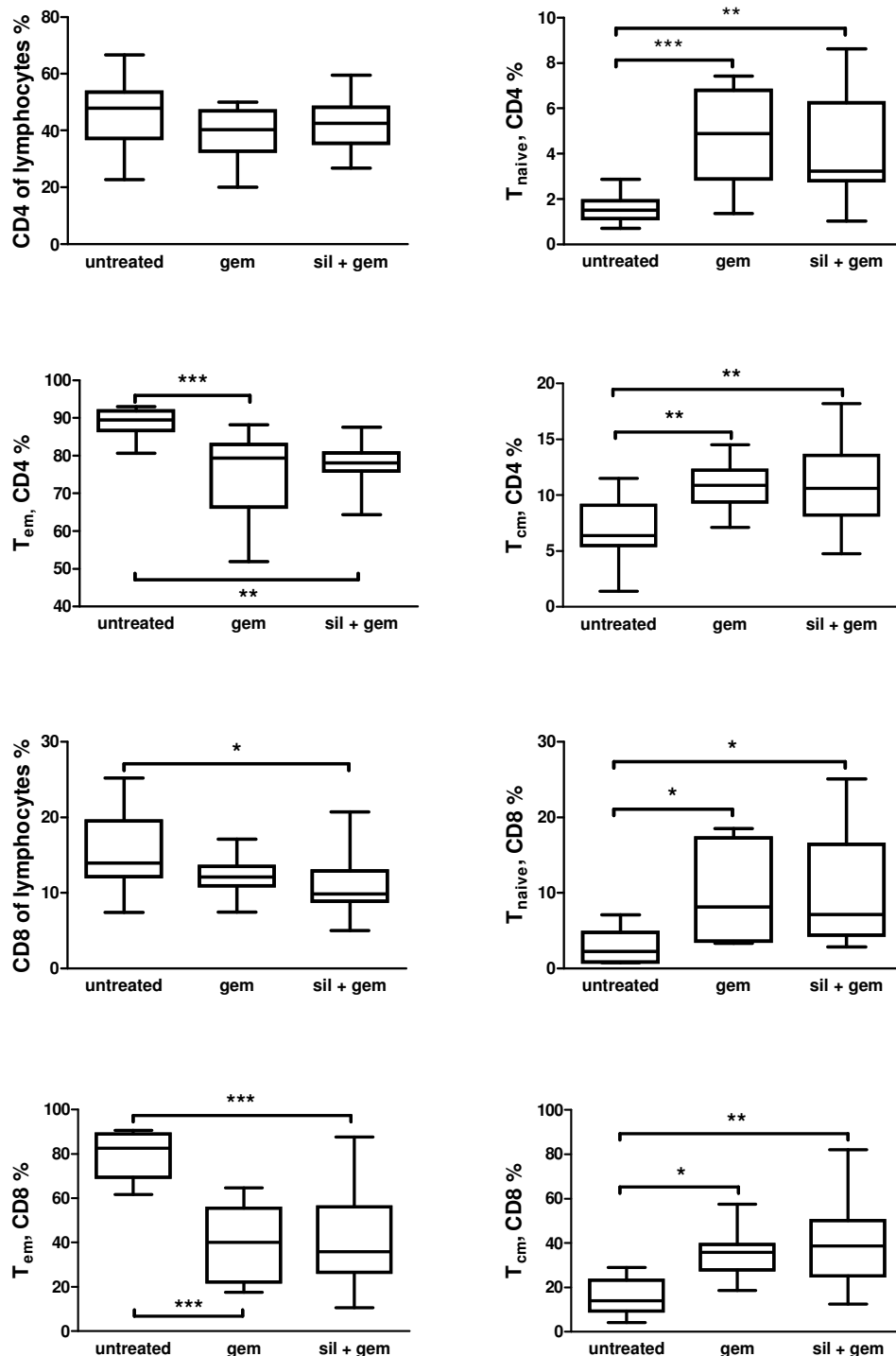


Abb.3.6.1. Quantifizierung der Lymphozytenpopulationen in Primärtumoren tumortragender Mäuse nach der Behandlung mit Sildenafil und Gem. Einzelzellsuspensionen der Tumoren wurden mit spezifischen Antikörpern inkubiert, anschließend die Anzahl spezifischer T-Zell-Populationen durchflusszytometrisch bestimmt und statistisch mittels unpaired *T*-test erfasst (SE, n = 15 pro Gruppe, *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001)

Hinsichtlich der Anzahl regulatorischer und konventioneller T-Zellen, sowie NK- und NK-T-Zellen stellt man fest, dass die niedrige Dosierung von Gem die Anzahl an T_{reg} senkt und T_{con} , NK- und NK-T-Zellen ansteigen (Abb. 3.6.2.).

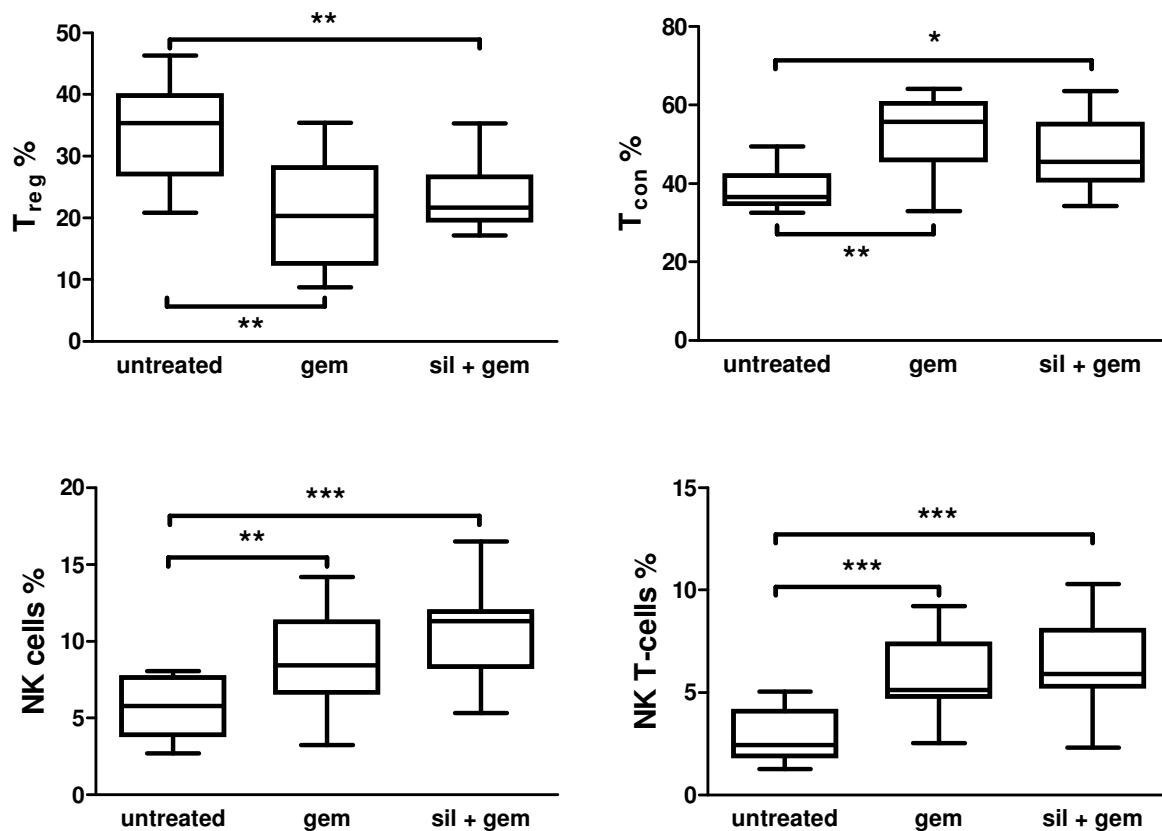


Abb.3.6.2. Quantifizierung von regulatorischen und konventionellen T-Zellen sowie NK- und NK-T-Zellen in Primärtumoren tumortragender Mäuse nach der Behandlung mit Sildenafil und Gem. Einzelzellsuspensionen der Tumoren wurden mit spezifischen Antikörpern inkubiert, anschließend durchflusszytometrisch bestimmt und statistisch mittels unpaired *T*-test erfasst (SE, n = 15 pro Gruppe, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$)

Desweiteren stand die Phänotypisierung von myeloiden Suppressorzellen im Mittelpunkt unserer Forschungsarbeiten. Hier kann jedoch gezeigt werden, dass die kombinierte Behandlung mit Gem im Gegensatz zur alleinigen Behandlung mit Sildenafil keine Vorteile bringt. Die Anzahl an MDSC ist hier nicht signifikant herabgesetzt (Abb. 3.6.3.). Eine mögliche Hypothese hierfür ist, dass Gem die positive Wirkung von Sildenafil eventuell zunichtemacht.

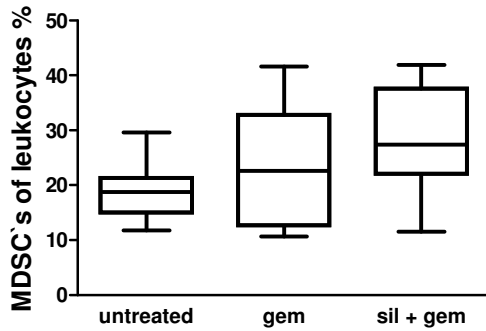
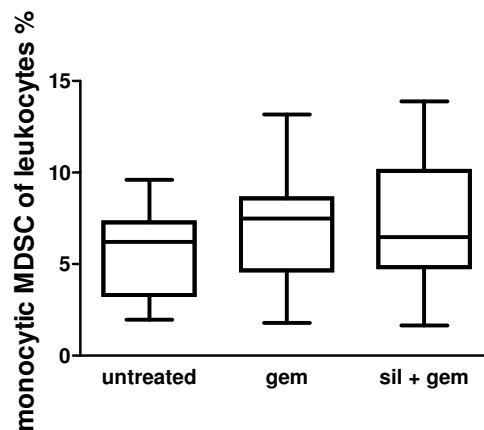
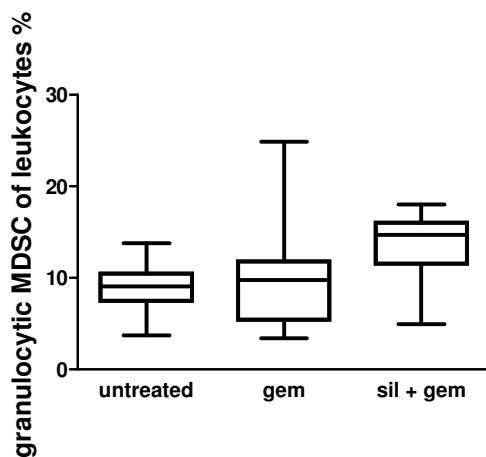


Abb.3.6.3. Quantifizierung von MDSC und deren beiden Subpopulationen in Primärtumoren tumortragender Mäuse nach der Behandlung mit Sildenafil und Gem. Einzelzellsuspensionen der Tumoren wurden mit spezifischen Antikörpern inkubiert, anschließend die Anzahl an MDSC durchflusszytometrisch bestimmt und mittels unpaired *T*-test erfasst (SE, n=15 pro Gruppe)



Bei den bisherigen Untersuchungen der Effekte der Kombinationsbehandlung mit Gem und Sildenafil waren keine Unterschiede in Bezug auf das Geschlecht festzustellen. Eine Ausnahme davon stellen jedoch dendritische Zellen dar. So kann im Allgemeinen betrachtet eine Hochregulierung von ausgereiften cDC`s und eine Herunterregulierung der Reifungsmarker CD80⁺ und CD86⁺ beobachtet werden (Abb. 3.6.4.). Teilt man diese Ergebnisse bezüglich des Geschlechts auf, so sieht man eine erhöhte Anzahl an plasmazytoiden DC`s und reifen cDC`s nur beim Weibchen (Abb. 3.6.5.). Auch kommt es beim Weibchen zu einer Hochregulierung von CD80⁺ bei pDC`s im Gegensatz zur Herunterregulierung beim Männchen (Abb. 3.6.6.). Zusätzlich kann beim männlichen Geschlecht eine Hochregulierung von CD86⁺ bei pDC`s und gleichzeitiger Herunterregulierung von CD86⁺ bei cDC`s festgestellt werden (Abb. 3.6.6.).

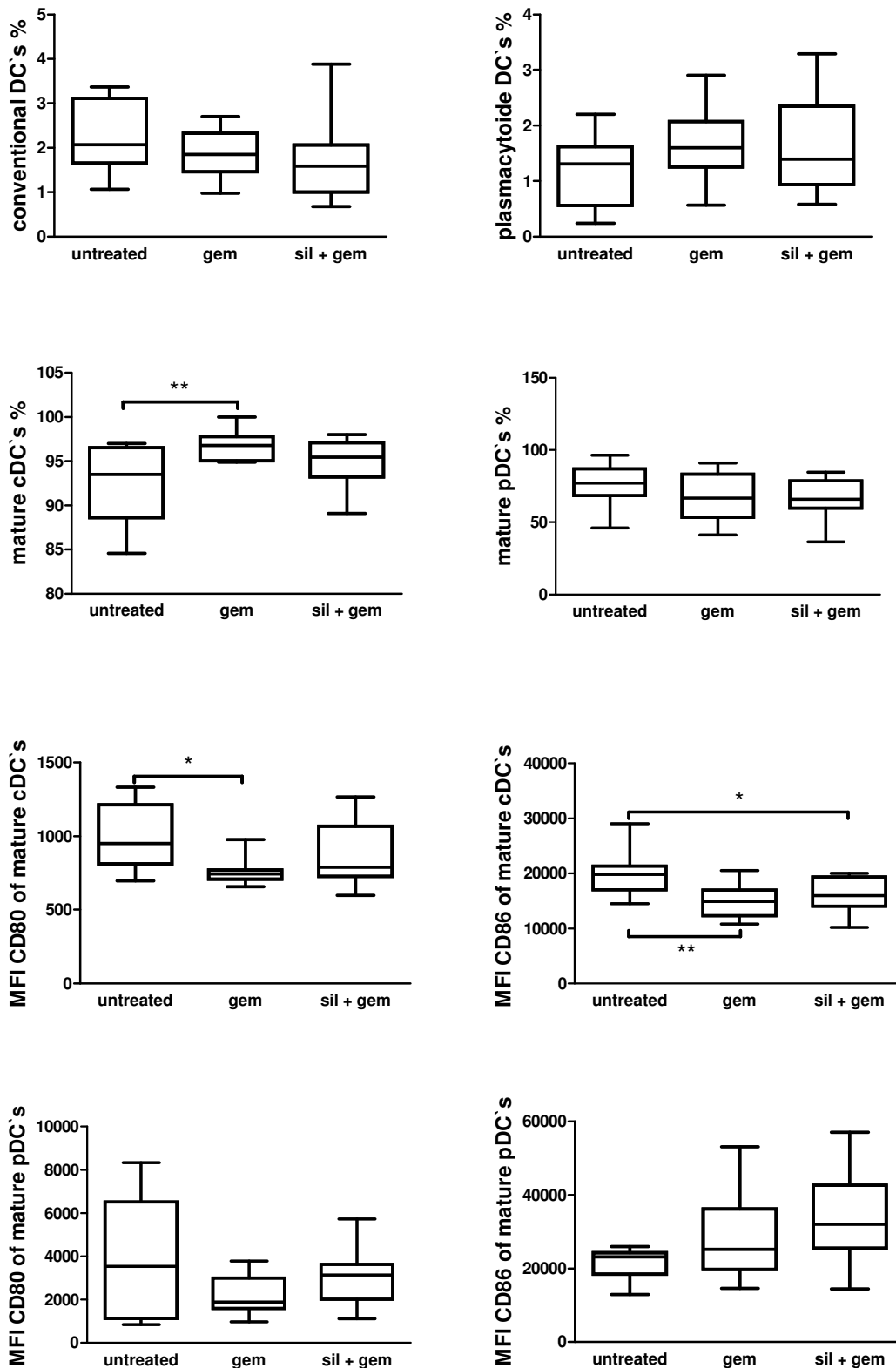


Abb.3.6.4. Quantifizierung von dendritischen Zellen in Primärtumoren tumortragender Mäuse nach der Behandlung mit Sildenafil und Gem. Einzelzellsuspensionen der Tumoren wurden mit spezifischen Antikörpern inkubiert, anschließend die Anzahl an cDC's und pDC's sowie die mittlere Fluoreszenzintensität (Mean fluorescence intensity, MFI) der Reifungsmarker CD80 und CD86 durchflusszytometrisch bestimmt und statistisch mittels unpaired *T*-test erfasst (SE, *n* = 15 pro Gruppe, **p*<0.05, ***p*<0.01)

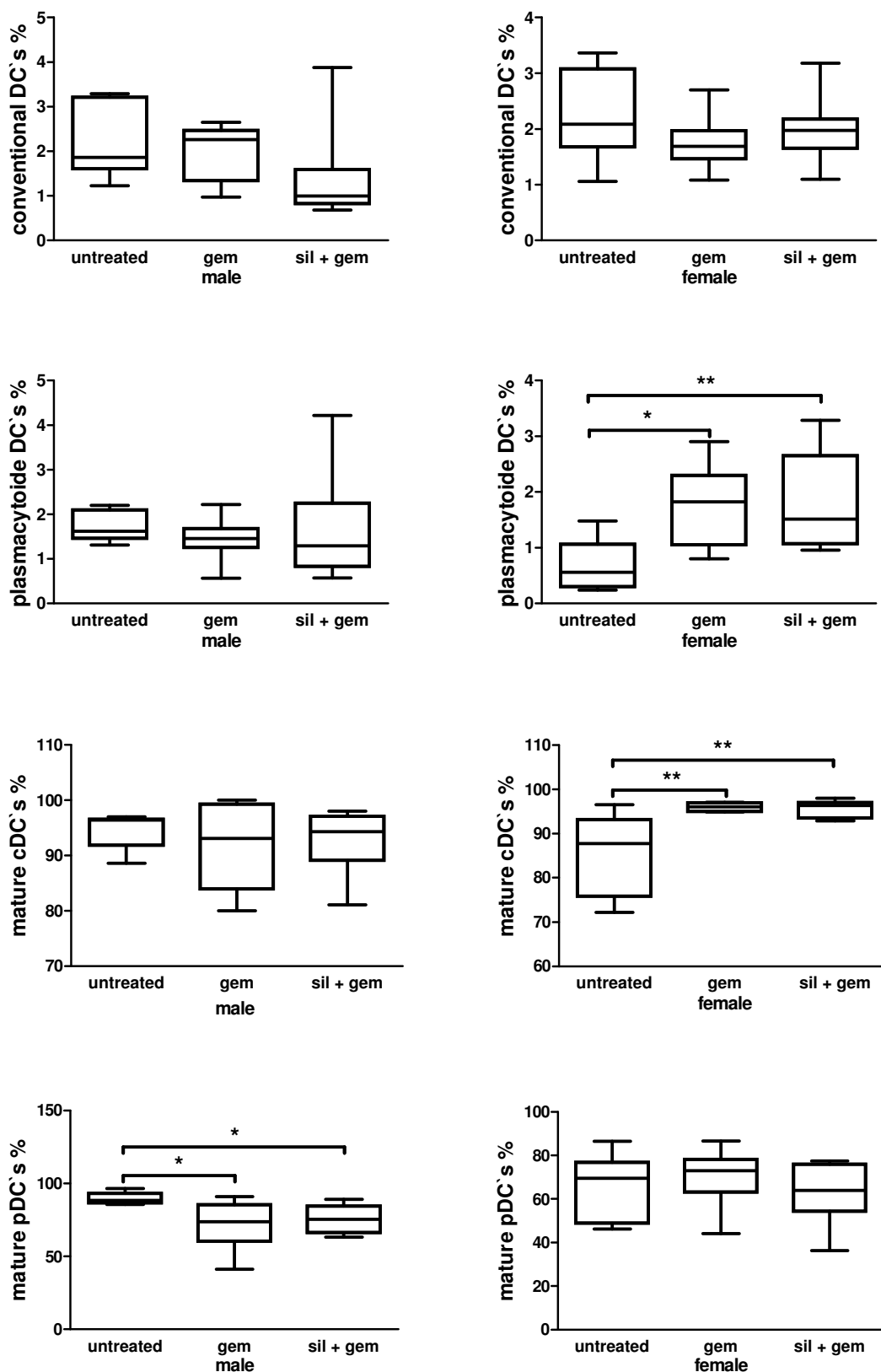


Abb.3.6.5. Quantifizierung von dendritischen Zellen in Primärtumoren tumortragender weiblicher und männlicher Mäuse nach der Behandlung mit Sildenafil und Gem. Einzelzellsuspensionen der Tumoren wurden mit spezifischen Antikörpern inkubiert, anschließend die Anzahl an cDC's und pDC's durchflusszytometrisch bestimmt und statistisch mittels unpaired T-test erfasst (SE, female n = 8 pro Gruppe, male n = 7 pro Gruppe, *p<0.05, **p<0.01)

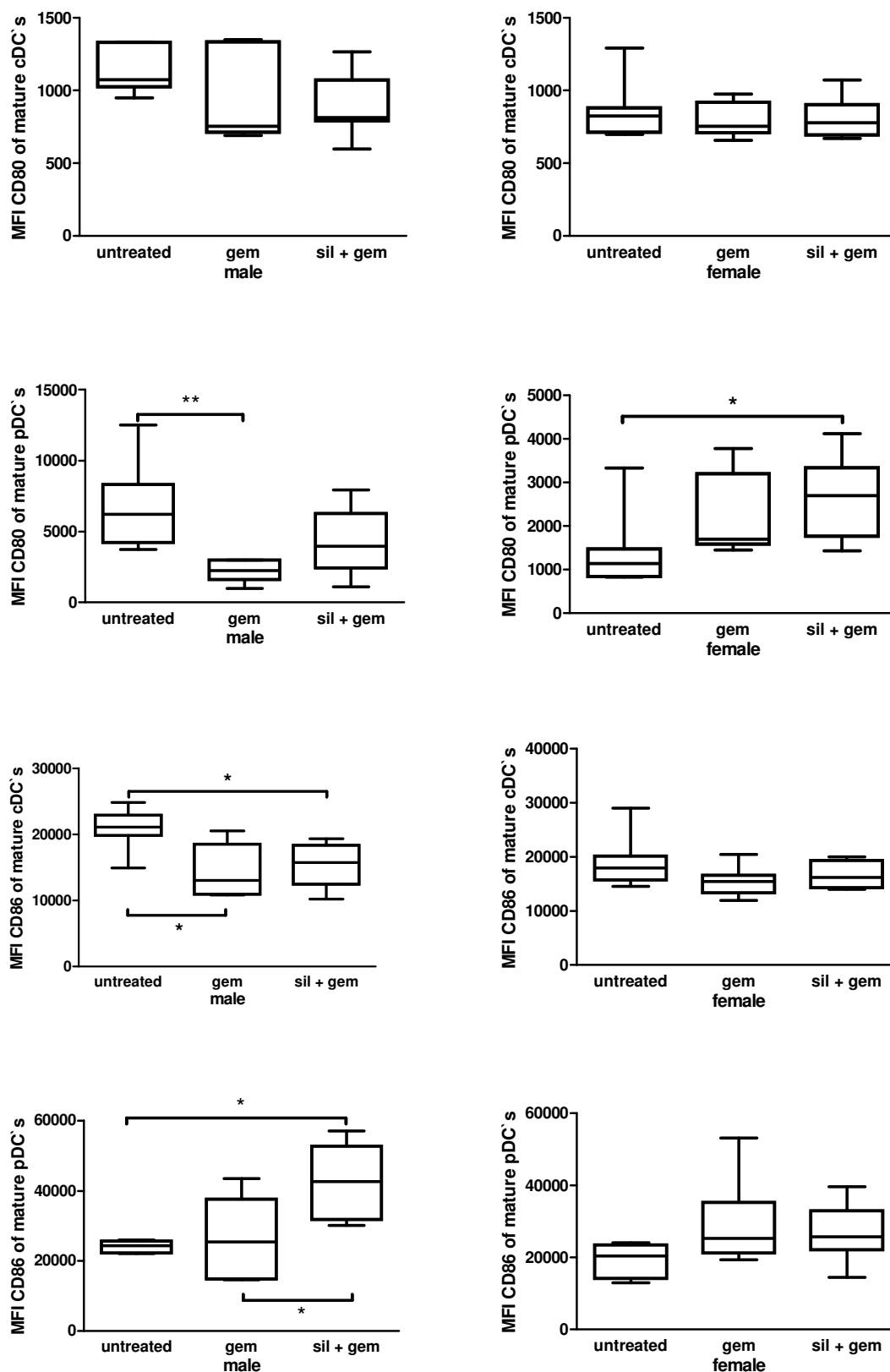


Abb.3.6.6. Bestimmung der mittleren Fluoreszenzintensität von dendritischen Zellen in Primärtumoren tumortragender weiblicher und männlicher Mäuse nach der Behandlung mit Sildenafil und Gem. (unpaired T-test, SE, female n = 8 pro Gruppe, male n = 7 pro Gruppe, *p<0.05, **p<0.01)

Im Gesamten betrachtet kann durch dieses Experiment gezeigt werden, dass die Überlebensrate mit der Kombinationstherapie nicht signifikant verlängert werden konnte. Trotz alledem ist sowohl beim weiblichen als auch beim männlichen Geschlecht eine Tendenz zu einer Verbesserung bzw. einer Verschlechterung der Überlebensrate zu sehen.

4. Diskussion

Das Pankreaskarzinom ist einer der aggressivsten Tumore mit ausgeprägter Metastasierungsrate und die Prognose meist infaust, da die Diagnose erst im fortgeschrittenen Stadium gestellt wird, bei dem eine chirurgische Therapie in den meisten Fällen nicht mehr in Betracht kommt. Meist sind zu diesem Zeitpunkt auch schon Fernmetastasen vorhanden. In diesem Hinblick und in Bezug auf die Resistenz gegenüber therapeutischen Maßnahmen ist es erforderlich, neue Behandlungsmöglichkeiten zu etablieren. So lieferte die Immuntherapie in den letzten Jahren vielversprechende Ergebnisse bei der Behandlung von Tumoren.

Tumore sind in der Lage sich dem Immunsystem über verschiedene Mechanismen zu entziehen. So können sie zum Beispiel durch verminderte Antigenpräsentation an deren Oberfläche für Zellen des Immunsystems unentdeckt bleiben und somit die Immunantwort umgehen.

Eine wichtige Rolle in Bezug auf die Immunsuppression spielen auf zellulärer Ebene die myeloiden Suppressorzellen und T_{reg} . MDSC sind eine heterogene Gruppe von Vorläuferzellen, die unter gesunden Bedingungen rasch zu reifen Granulozyten, Makrophagen und dendritischen Zellen differenzieren. Beim Tumorgeschehen ist diese Differenzierung jedoch gestört und es entwickeln sich die myeloiden Suppressorzellen (Gabrilovich et al. 2009). Diese Zellen produzieren immunmodulierende Zytokine mit immunsuppressiver Wirkung und die beiden Enzyme iNOS und Arg1, welche T-Zellen schädigen (Bronte et al. 2005; Serafini et al. 2006). MDSC sind besonders im Knochenmark, Milz, metastasierten Lymphknoten und Tumorstroma lokalisiert (Serafini et al. 2004; Serafini et al. 2006; Marigo et al. 2008). $CD4^+CD25^+FoxP3^+$ -Zellen sind die bekanntesten natürlich vorkommenden regulatorischen T-Zellen des Immunsystems, die immunsuppressive Funktion haben (Sakaguchi et al. 1995). Sie spielen bei der Aufrechterhaltung der Selbstregulierung des Immunsystems eine unabdingbare Rolle, da sie überschießende Immunreaktionen verhindern und somit Autoimmunkrankheiten entgegenwirken (Hsieh et al. 2012). Für diese Immunsuppression stellen erhöhte Mengen an cAMP eine Schlüsselfunktion dar, welches mittels sogenannter "gap junctions" von T_{reg} auf T_{con} übertragen wird und somit zu deren Kontrolle dient (Bopp

et al. 2007). Zwischen MDSC und T_{reg} konnten Interaktionen festgestellt werden, wodurch MDSC T_{reg}-Proliferation auslösen können (Serafini et al. 2008).

In der vorliegenden Arbeit wurde der PDE-5 Inhibitor Sildenafil alleine oder in Kombination mit dem Chemotherapeutikum Gem beim Pankreaskarzinom eingesetzt, um die immunsuppressive Wirkung von NO und Arg1 produzierenden MDSC zu schwächen und somit die antitumorale T-Zellimmunantwort zu stimulieren. Es wurden Leukozyten, insbesondere Gr-1⁺CD11b⁺ myeloide Suppressorzellen im orthotopen Pankreaskarzinommodell charakterisiert und die Überlebensrate bei tumortragenden Mäusen bestimmt. Schon beim malignen Melanom konnte durch Einsatz von Sildenafil eine signifikante Verbesserung der Überlebensrate erreicht werden (Meyer et al. 2011). Zudem konnte in der Vergangenheit nachgewiesen werden, dass durch eine solche Behandlung die Expression von Arg1 und iNOS bei intratumoralen MDSC verringert wird (Serafini et al. 2006). Wir konnten durch unseren Versuch zeigen, dass die Behandlung mit Sildenafil auf das Überleben allgemein keinen Effekt ausübt, aber nach getrenntgeschlechtlichen Analysen kam es zu einer signifikant verlängerten Überlebensrate bei den weiblichen Mäusen mit Pankreaskarzinom. Diese Tatsache bestätigt die Ergebnisse der vorhergehenden Arbeit beim malignen Melanom, allerdings geht in diesem Zusammenhang nicht hervor, auf welches Geschlecht es sich bezieht und ob auch hier eventuelle Unterschiede vorliegen. Somit konnte gezeigt werden, dass die Ergebnisse beider Arbeiten im Allgemeinen übereinstimmen, aber neu in diesem Zusammenhang ist die Tatsache, dass die Wirkung von Sildenafil beim weiblichen Geschlecht einen signifikant besseren Effekt hat als dies beim männlichen Geschlecht der Fall ist. Eine genaue Ursache für diesen Sachverhalt ist schwer abzuschätzen, könnte jedoch eventuell in Zusammenhang mit einer unterschiedlichen Expression der Phosphodiesterase-5 stehen. Im Hinblick auf diese Erkenntnis der geschlechtsabhängigen Wirkung von Sildenafil und deren Ursache werden noch weitere Untersuchungen folgen.

Neben einer gesteigerten Überlebensrate basiert der Erfolg einer anti-Tumorthherapie zudem auf den Parametern Tumorgöße und Metastasierungsrate.

In Bezug auf das Tumolvolumen konnte in unserem Experiment nach Behandlung mit Sildenafil keine Verkleinerung nachgewiesen werden, stattdessen kam es bei den weiblichen Mäusen zu einer signifikanten Vergrößerung des Tumolvolumens. Dieses Ergebnis korreliert mit dem Ergebnis der signifikant verlängerten Überlebensrate bei

den weiblichen Mäusen. Hinsichtlich dieser Tatsache liegen bisher keine Informationen aus der Literatur vor, jedoch kann eventuell angenommen werden, dass es trotz des ausbleibenden Effekts auf das Tumervolumen zu einer Stabilisierung des Tumorwachstums kommt. Es konnte bereits beim murinen Kolonkarzinom- und Brustkrebsmodell gezeigt werden, dass die Behandlung mit Sildenafil das Tumorwachstum verlangsamen kann (Serafini et al. 2006). Eine zweite Möglichkeit dieser Veränderung könnte als Effekt von MDSC ausgehend betrachtet werden, bei dem es zu einer vermehrten Anzahl an tumorinfiltrierenden Lymphozyten kommt. Dadurch reduziert sich die Anzahl an MDSC, wie wir in unserem Versuch zeigen konnten, mit der Folge, dass es beim Weibchen zu einem Anstieg an zytotoxischen CD8⁺ T-Zellen kommt. Beim Männchen, bei dem es zu keiner Reduzierung an MDSC kommt, wird dagegen ein Absinken an CD4⁺ T-Zellen beobachtet. Diese Hypothese kann durch vorliegende Ergebnisse von Serafini et al. (2006) bestärkt werden, da es auch hier durch Sildenafilbehandlung zu einer Erhöhung der zytotoxischen CD8⁺ T-Zellen kam und gleichzeitig die T-Zellinfiltration des Tumors verstärkt wurde (Serafini et al. 2006).

Durch intrazelluläres Blockieren von PDE-5 kommt es zu einem Anstieg des cGMP-Spiegels, der wiederum auf mRNA-Ebene iNOS hemmt und dadurch weniger NO sekretiert wird (Serafini et al. 2006). Die Untersuchungen der Wirkung von Sildenafil auf MDSC bezüglich iNOS und Arg1 wurden hier nicht durchgeführt, da bereits andere Gruppen diese Wirkung berichteten und davon auszugehen ist, dass dieser Mechanismus hier beim Pankreaskarzinommodell ebenso vorliegt (Serafini et al. 2006; Meyer et al. 2011). Das Ziel, die immunsuppressorischen Auswirkungen der MDSC auf T-Zellen zu schwächen, wurde mit Sildenafilbehandlung tumortragender Mäuse erreicht.

In der Vergangenheit wurde beschrieben, dass MDSC die Entwicklung von regulatorischen T-Zellen aktiviert (Serafini et al. 2008). Demnach kommt es sowohl zu einer vermehrten Bildung von natürlichen T_{reg}, als auch zu einer Aktivierung der Umwandlung von naiven CD4⁺ T-Zellen zu induzierten T_{regs} (Huang et al. 2006; Gabrilovich et al. 2012). Die genauen Gründe hierfür sind jedoch noch nicht bekannt. Man vermutet, dass eventuell Zell-Zellkontakt, sowie Faktoren wie IFN- γ , IL-10, TGF- β und die Expression von Arg1 eine Rolle spielen könnten (Huang et al. 2006; Serafini et al. 2008; Pan et al. 2010). Allerdings führte die Abnahme der MDSC Menge nicht zu einer Verminderung der T_{reg} Anzahl in unserer Arbeit. Daher konnten

die Interaktionen zwischen MDSC und regulatorischen T-Zellen in unserem Versuch nicht bestätigt werden. Die Gründe hierfür sind jedoch nicht bekannt.

Als Schlussfolgerung kann gesagt werden, dass die Behandlung mit Sildenafil beim Pankreaskarzinom die Anzahl an myeloiden Suppressorzellen beim weiblichen Geschlecht signifikant herunterreguliert und das Tumolvolumen ansteigen lässt. Um zu klären, welche metabolischen Mechanismen mit der Tumorgroße in Zusammenhang stehen, werden weitere Untersuchungen folgen.

In Bezug auf die unterschiedliche Wirkung von Sildenafil auf das Geschlecht stellt sich die Frage in welcher Hinsicht dieses Phänomen besteht. Zur Klärung, ob diese Tatsache eventuell in Abhängigkeit des Tumors steht, wurde die Behandlung mit Sildenafil an gesunden Mäusen durchgeführt. Auch hier kamen wir zu dem Ergebnis, dass Sildenafil beim weiblichen Geschlecht einen immunstimulierenden Effekt ausübt und beim männlichen Geschlecht ein negativer Effekt mit Reduzierung von CD4⁺ T-Lymphozyten einhergeht. Diese entgegengesetzte Wirkung auf T-Lymphozyten sowohl bei tumortragenden als auch bei gesunden Mäusen lässt annehmen, dass die unterschiedliche Wirkung von Sildenafil ein generelles Phänomen zu sein scheint, das nicht in Zusammenhang mit dem Tumorgeschehen steht. In gesunden Mäusen konnten wir nur einen geringen Effekt von Sildenafil auf MDSC finden, sodass dadurch gezeigt werden kann, dass Sildenafil aus immunologischer Hinsicht im Tumorgeschehen einen weitaus größeren Stellenwert einnimmt als beim gesunden Organismus.

Sildenafil wird heutzutage therapeutisch zur Behandlung der erektilen Dysfunktion sowie zur Behandlung der idiopathischen pulmonal-arteriellen Hypertonie eingesetzt. Aufgrund unserer Ergebnisse der negativen Wirkung von Sildenafil auf das männliche Geschlecht (Reduzierung der Anzahl an CD4⁺ T-Lymphozyten) sind somit weitere Nebenwirkungen nicht auszuschließen und müssen demnach weiter abgeklärt werden.

Um herauszufinden, ob Sildenafil einen direkten oder indirekten Effekt auf Leukozyten hat, wurden diese aus peripherem Blut von gesunden Probanden isoliert, anschließend 24 Stunden *ex vivo* mit verschiedenen Sildenafilkonzentrationen kultiviert und mittels FACS-Analysen phänotypisiert. Dieser Versuch brachte nur minimale Effekte von Sildenafil auf humane Leukozyten und obwohl diese zwar statistische Signifikanz zeigten, stellt sich hier jedoch die Frage, in welcher Hinsicht diese Werte auch physiologische Relevanz haben. Im Ganzen betrachtet spielt

Sildenafil daher im Zusammenhang mit humanen Leukozyten aus peripherem Blut von gesunden Probanden eher eine untergeordnete Rolle und es muss in dieser Hinsicht eher auf Interaktionen im Immunsystem näher eingegangen werden.

Es konnte in vergangenen Studien gezeigt werden, dass Sildenafil einen positiven Einfluss auf den chemotherapeutischen Effekt von Doxorubicin beim Prostata- und Brustkrebs hat (Di et al. 2010; Das et al. 2010) und ABC-Transporter wie ABCB1 und ABCB2 in ihrer Aktivität hemmt (Shi et al. 2011). Somit spielt Sildenafil eine positive Rolle bei der zunehmenden Resistenz gegenüber Arzneimitteln.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde Sildenafil zum Schluss zusammen mit dem Standardchemotherapeutikum Gem eingesetzt, mit dem Ziel die Effizienz von Gem durch Sildenafil zu verstärken. Die von uns verwendete Dosierung von Gem (15mg/kg Körpergewicht) entsprach dabei $\frac{1}{10}$ der normalen therapeutischen Dosis, um den Tumor nicht vollständig zu entfernen und die Effekte von Sildenafil nicht zu verschleiern. Zu der verwendeten Dosierung liegen bei Gem bisher keinerlei Informationen vor, die in Zusammenhang mit Sildenafil stehen.

Die Ergebnisse der Kombinationstherapie in Bezug auf das Überleben weisen im Allgemeinen keine Unterschiede auf, jedoch ist aber eine geschlechterabhängige Tendenz zu sehen. Demnach scheinen die Weibchen besser auf Gem zu reagieren, da sie auch hier eine Tendenz zur Verbesserung der Überlebensrate zeigen. Eine Verstärkung der Effizienz von Gem konnte durch Sildenafil nicht erreicht werden, es kam eher zu negativen Auswirkungen beim männlichen Geschlecht. In welcher Hinsicht dabei die Dosierung von Gem eine Rolle spielt, muss in weiteren Versuchen mit höherer Dosierung ($\frac{1}{5}$) geklärt werden. Auch ist in diesem Zusammenhang die Kombination Sildenafil und Gem in Frage gestellt und sollte eventuell in weiteren Versuchen beim weiblichen Geschlecht durch das Chemotherapeutikum 5-FU ersetzt werden, das nach der ESPAC-3 Studie (2000-2009) in seiner Wirksamkeit Gem gleichgestellt ist.

Schon die alleinige Behandlung mit Gem hat immunologischen Einfluss auf die Anzahl von T-Lymphozyten und dendritischen Zellen. So war durch die niedrige Dosierung ein herunterregulierender Effekt auf die Expression von T_{reg} zu sehen und gleichzeitig konnte die Anzahl an T_{con} , NK- und NK-T-Zellen erhöht werden. Eine Verminderung an MDSC war jedoch durch die Kombinationstherapie nicht festzustellen und daher scheint Gem einen negativen Effekt auf Sildenafil auszuüben, da durch die alleinige Behandlung mit Sildenafil bei den Weibchen eine

signifikante Reduzierung von MDSC erreicht werden konnte. In diesem Zusammenhang bleibt die Frage offen, inwieweit und welche Wechselwirkungen zwischen dem Chemotherapeutikum Gemcitabin und dem PDE-5 Inhibitor Sildenafil beim Pankreaskarzinom bestehen. Um dies zu klären sind in der Zukunft weitere Studien nötig, die gegebenenfalls auch hier ein Ersetzen von Gem durch 5-FU erforderlich machen.

Die hier gezeigte Strategie, MDSC-vermittelte Immunsuppression durch Sildenafil abzuschwächen und somit eine signifikante Verbesserung der Überlebensrate zu erreichen, ermöglicht neue Perspektiven bei der immunologischen Behandlung von weiblichen Pankreaskarzinompatienten. So könnte Sildenafil eventuell als palliative Therapie oder gegebenenfalls auch als adjuvante Therapie bei Frauen eingesetzt werden. Zudem könnte eine weitere Möglichkeit in der Vakzinierung mit entsprechenden Antigenen in Kombination mit Sildenafil bestehen. Für den Einsatz auf diesem Gebiet sind jedoch noch weitere Forschungsarbeiten nötig.

Zusammenfassend kann mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass das Immunsystem eine wichtige Rolle in Bezug auf das Tumorgeschehen spielt und sich somit neue Perspektiven für die Immuntherapie bei Pankreaskarzinompatienten eröffnen.

5. Zusammenfassung

Das Pankreaskarzinom ist ein besonders aggressiver Tumor, der durch ausgeprägtes Metastasierungspotential und Resistenz gegenüber Chemotherapie oder Bestrahlung gekennzeichnet ist und bei dem die Diagnose meist erst im fortgeschrittenen Krankheitsstadium gestellt wird, bei dem keine Hoffnung auf Heilung besteht. Während der Tumorprogression kommt es zur Anreicherung von myeloiden Suppressorzellen (MDSC) im Primärtumor und in sekundären lymphatischen Organen, wodurch die antitumorale Immunantwort unterdrückt wird. Bei dem Wirkstoff Sildenafil handelt es sich um einen Phosphodiesterase-5 Inhibitor, der die immunsuppressive Wirkung von MDSC unterdrückt. In der vorliegenden Arbeit wurde die Wirkung von Sildenafil auf die Überlebensrate tumortragender Mäuse alleine und in Kombination mit dem Chemotherapeutikum Gemcitabin untersucht und Leukozyten phänotypisch charakterisiert, mit dem Ziel die immunsuppressiven Wirkungen von MDSC zu neutralisieren und dadurch antitumorale T-Zellimmunantworten zu stimulieren.

Es konnte gezeigt werden, dass die Behandlung mit Sildenafil die Überlebensrate bei weiblichen Mäusen signifikant verlängert. Zudem konnte die Anzahl an MDSC im Primärtumor bei den Weibchen signifikant reduziert werden, sodass es bei diesen zu einem signifikanten Anstieg an naiven CD8⁺ T-Zellen kam. Bei der Kombinationsbehandlung mit Sildenafil und Gemcitabin konnte die Überlebensrate nicht signifikant verlängert werden.

Die Anzahl an CD4⁺ T-Zellen, sowie T_{em} und T_{cm} war bei gesunden männlichen Mäusen nach Sildenafilbehandlung signifikant erniedrigt. Bei den gesunden Weibchen kam es zu einem signifikanten Anstieg an T_{cm} und einer Reduzierung von Gr-1⁺CD11b⁺ Zellen. Durch den Einsatz von Gemcitabin konnte die Anzahl an regulatorischen T-Zellen signifikant reduziert werden. Unsere Versuchsdaten haben somit gezeigt, dass die Wirkung von Sildenafil geschlechtsabhängig ist und bei den Weibchen einen positiven Effekt ausübt. Dadurch konnte die Unterdrückung der immunsuppressiven Wirkung von MDSC durch Sildenafil beim weiblichen Geschlecht bestätigt werden und stellt somit eine Grundlage für neue Möglichkeiten in der Behandlung des humanen Pankreaskarzinoms dar.

6. Summary

Pancreatic cancer is a very aggressive tumor, which is characterized by a strong metastatic potential. It is resistant against currently treatments like chemotherapy or radiation. The diagnosis is often made in an advanced stage, where the prognosis is infaust. Only 15-20 % patients have the chance to get tumor resected at the time of diagnosis, and the survival rate of 5 years is only about 5%. Pancreatic cancer death is one of the most frequent causes of cancer death worldwide.

During tumor progression myeloid derived suppressor cells (MDSC) are enriched in the tumor stroma and in secondary lymphatic organs. This leads to a suppression of the antitumor immune response. Sildenafil is a phosphodiesterase-5 inhibitor which exerts antitumor effect by abrogating MDSC immunosuppressive functions.

In this study, we investigated effects of sildenafil on the survival rate of tumor-bearing mice and immune cells as a single agent and combined with gemcitabin, with the aim to neutralize the immunosuppressive functions of MDSC and to stimulate antitumor T-cell responses.

We have shown that treatment with sildenafil results in a significant prolongation of the survival rate in female mice, while the tumor volume was increased. We could also reduce the amount of MDSC in the primary tumor of female mice, which resulted in an increased number of naive CD8⁺ T-cells. The survival rate of mice receiving gemcitabin plus sildenafil was not prolonged.

The number of CD4⁺ T-cells and also the number of T_{em} and T_{cm} was significant decreased in healthy male mice after the treatment with sildenafil. In healthy female mice the number of T_{cm} was significant increased und the amount of Gr-1⁺CD11b⁺ cells was reduced.

With the use of gemcitabin the number of regulatory T-cells was significant reduced und the amount of T_{con}, NK- and NK-T-cells was increased.

Summarizing, we have shown that the anti-tumor effect of sildenafil is gender-dependent and exerts a positive impact on females. Thereby, the inhibition of the immunosuppressive function of MDSC by sildenafil was confirmed and so this could be a base for new strategies in the treatment of human pancreatic cancer.

III. Literaturverzeichnis

Allema JH, Reinders ME, van Gulik et al. (1995) *"Prognostic factors for survival after Pancreat icoduodenectomy for patients with carcinoma of the pancreatic head region"* Cancer 75:2069–76

Almhanna K., Philip P.A. (2011) *"Defining New Paradigms for the Treatment of Pancreatic Cancer"* Curr Treat Options Oncol. 12:111-125

Asselin-Paturel, C. et al (2001) *"Mouse type I IFN-producing cells are immature APC's with plasmacytoid morphology"* Nat. Immunol. 2, 1144-1150

Asseman, C., S. Mauze, M.W. Leach, R.L. Coffman, and F. Powrie (1999) *"An essential role for interleukin 10 in the function of regulatory T cells that inhibit intestinal inflammation"* J Exp Med 190:995-1004

Azuma T, Takahashi T, Kunisato A, Kitamura T, Hirai H. *"Human CD4+ CD25+ regulatory T cells suppress NKT cell functions"* Cancer Res. 2003;63:4516-4520

Banchereau, J., Steinman, R. M. (1998) *"Dendritic cells and the control of immunity"* Nature 392(6673): 245-52

Baniyash, M. (2004) *"TCR zeta-chain downregulation: curtailing an excessive inflammatory immune response"* Nat Rev Immunol 4(9): 675-87

Barry M., Heibei J.A., Pinkoski M.J., Lee S.F., Moyer R.W., Green D.R., Bleackley R.C. (2000) *"Granzyme B short-circuits the need for caspase 8 activity during granule-mediated cytotoxic T-lymphocyte killing by directly cleaving bid"* Mol Cell Biol 20(11):3781-3794

Bazhin A.V., Kahnert S., Kimpfler S., Schadendorf D., Umansky V. (2010) *"Distinct metabolism of cyclic adenosine monophosphate in regulatory and helper CD4+ T cells"* Mol Immunol. 47(4):678-84

Beavis P.A., Stagg J., Darcy P.K., Smyth M.J. (2012) *"CD73: a potent suppressor of antitumor immune responses"* Trends Immunol. 1-7

Bennett PF, Hahn KA, Toal RL, Legendre AM *"Ultrasonographic and cytopathological diagnosis of exocrine pancreatic carcinoma in the dog and cat"* J Am Anim Hosp Assoc 2001;37(5):466-473

- Beyer M., Schultze J.L. (2006) "Regulatory T cells in cancer" *Blood*. 1;108(3):804-11
- Bopp T., Becker C., Klein M., Klein-Hessling S., Palmetshofer A., Serfling E., Heib V., Becker M., Kubach J., Schmitt S., Stoll S., Schild H., Staeger M.S., Stassen M., Jonuleit H., Schmitt E. (2007) "*Cyclic adenosine monophosphate is a key component of regulatory T cell-mediated suppression*" *J Exp Med*. 204(6):1303-10
- Boyle P, Maisonneuve P et al. (1996) "*Cigarette smoking and pancreas cancer: A case control Study of the SEARCH programme of the IARC*" *Int J Cancer* 67:63-71
- Bronte, V., Kasic, T., Gri, G., Gallana, K., Borsellino, G., Marigo, I., Battistini, L., Iafrate, M., Prayer-Galetti, T., Pagano, F. und Viola, A. (2005) "*Boosting antitumor responses of T lymphocytes infiltrating human prostate cancers*" *J Exp Med* 201(8): 1257-68
- Brugge, W.R., Lauwers, G.Y., Sahani, D., Fernandez-del Castillo, C., and Warshaw, A.L. 2004 "*Cystic neoplasms of the pancreas*" *N. Engl. J. Med.* 351: 1218–1226
- Brunner, T. B., K. A. Cengel, et al. (2005) "*Pancreatic cancer cell radiation survival and prenyltransferase inhibition: the role of K-Ras*" *Cancer Res* 65(18): 8433-41
- Burris H. und Storniolo A.M. (1997) "*Assessing clinical benefit in the treatment of pancreas cancer: gemcitabine compared to 5-fluorouracil*" *Eur J Cancer* 33 Suppl 1:18-22
- Burris H.A., Moore M.J., Anderson J. et al. (1997) "Improvements in survival and clinical benefit with gemcitabin as firstline therapy for patients with advanced pancreatic cancer: a randomized trial" *J Clin Oncol*. 15:2403-2413
- Cella M., Jarrossay D., Facchetti F., Alebardi O., Nakajima H., Lanzavecchia A., et al. (1999) "*Plasmacytoid monocytes migrate to inflamed lymph nodes and produce large amounts of type I interferon*" *Nat Med*;5(8):919-23
- Cesana, G.C., G. DeRaffele, S. Cohen, D. Moroziewicz, J. Mitcham, J. Stoutenburg, K. Cheung, C. Hesdorffer, S. Kim-Schulze, and H.L. Kaufman (2006) "*Characterization of CD4+CD25+ regulatory T cells in patients treated with high-dose interleukin-2 for metastatic melanoma or renal cell carcinoma*" *J Clin Oncol* 24:1169-1177
- Chen, M. L., Wang, F. H., Lee, P. K. und Lin, C. M. (2001) "*Interleukin-10-induced T cell unresponsiveness can be reversed by dendritic cell stimulation*" *Immunol Lett* 75(2): 91-6

Chen W. "Dendritic cells and (CD4+)CD25+ T regulatory cells: crosstalk between two professionals in immunity versus tolerance" *Front Biosci.* 2006;11:1360-1370

Conroy T, Desseigne F, Ychou M, Bouché O, Guimbaud R, Bécouarn Y, Adenis A, Raoul JL, Gourgou-Bourgade S, de la Fouchardière C, Bennouna J, Bachet JB, Khemissa-Akouz F, Péré-Vergé D, Delbaldo C, Assenat E, Chauffert B, Michel P, Montoto-Grillot C, Ducreux M; Groupe Tumeurs Digestives of Unicancer; PRODIGE Intergroup (2011) "*FOLFIRINOX versus Gemcitabine for Metastatic Pancreatic Cancer*" *N Engl J Med* 364: 1817-1825

Coyle AJ., Gutierrez-Ramos JC. (2011) "*The expanding B7 superfamily: increasing complexity in costimulatory signals regulating T cell function*" *Nat Immunol* 2(3):203-9

Dahme E., Weiss E., Hafner-Marx A., Käufer-Weiss I., Matiassek K., Pospischil A., Reinacher M., Rudolph R., Schäffer E., Schmahl W., Schmidt P. und Teifke J.P. (2007) "*Grundriss der speziellen pathologischen Anatomie der Haustiere*" Enke Verlag, 6. Auflage

Das A, Durrant D, Mitchell C, Mayton E, Hoke NN, Salloum FN, et al. (2010) "*Sildenafil increases chemotherapeutic efficacy of doxorubicin in prostate cancer and ameliorates cardiac dysfunction*" *Proc Natl Acad Sci USA* 107:18202–7

Deaglio, S., Dwyer, K. M., Gao, W., Friedman, D., Usheva, A., Erat, A., Chen, J. F., Enjoji, K., Linden, J., Oukka, M., Kuchroo, V. K., Strom, T. B. und Robson, S. C. (2007) "*Adenosine generation catalyzed by CD39 and CD73 expressed on regulatory T cells mediates immune suppression*" *J Exp Med* 204(6): 1257-65

Di X, Gennings C, Bear HD, Graham LJ, Sheth CM, White KL Jr., et al. (2010) "*Influence of the phosphodiesterase-5 inhibitor, sildenafil, on sensitivity to chemotherapy in breast tumor cells*" *Breast Cancer Res Treat* 124:349–60

Elizabeth M. Jaffee (1999) "Immunotherapy of Cancer" *Annals of the New York Academy of Sciences* 886:67-72

Farag S. S., Fehniger T. A., Ruggeri L., Velardi A. and Caligiuri M. A. (2002) "*Natural killer cell receptors: new biology and insights into the graft-versus-leukemia effect*" *Blood* 100, 1935-47

Ferrandina, G., Ranelletti, F. O., Legge, F., Salutari, V., Martinelli, E., Fattorossi, A., Lorusso, D., Zannoni, G., Vellone, V., Paglia, A. und Scambia, G. (2006) "*Celecoxib up-regulates the expression of the zeta chain of T cell receptor complex in tumorinfiltrating lymphocytes in human cervical cancer*" *Clin Cancer Res* 12(7 Pt 1): 2055-60

- Fontenot, J.D., Gavin M.A., Rudensky A.Y. 2003 *"Foxp3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells"* Nat Immunol 4:330-336
- Forster, R., Schubel, A., Breitfeld, D., Kremmer, E., Renner-Müller, I., Wolf, E. und Lipp, M. (1999) *"CCR7 coordinates the primary immune response by establishing functional microenvironments in secondary lymphoid organs"* Cell 99(1): 23-33
- Fuchs C.S. et al. (1996) *"A prospective study of cigarette smoking and the risk of pancreatic cancer"* Arch Intern Med;156:2255-2260
- Gabrilovich, D. I. und Nagaraj, S. (2009) *"Myeloid-derived suppressor cells as regulators of the immune system"* Nat Rev Immunol 9(3): 162-74
- Gabrilovich D.I., Ostrand-Rosenberg S., Bronte V. (2012) *"Coordinated regulation of myeloid cells by tumours"* Nat Rev Immunol. 12(4):253-68
- Gallina, G., Dolcetti, L., Serafini, P., De Santo, C., Marigo, I., Colombo, M. P., Basso, G., Brombacher, F., Borrello, I., Zanovello, P., Bucciato, S. und Bronte, V. (2006) *"Tumors induce a subset of inflammatory monocytes with immunosuppressive activity on CD8+ T cells"* J Clin Invest 116(10): 2777-90
- Goulart MR, Pluhar GE, Ohlfest JR (2012) *"Identification of Myeloid Derived Suppressor Cells in Dogs with Naturally Occurring Cancer"* PLoS ONE 7(3): e33274. doi:10.1371/journal.pone.0033274
- Gruber, I. V., El Yousfi, S., Durr-Storzer, S., Wallwiener, D., Solomayer, E. F. und Fehm, T. (2008) *"Down-regulation of CD28, TCR-zeta (zeta) and up-regulation of FAS in peripheral cytotoxic T-cells of primary breast cancer patients"* Anticancer Res 28(2A): 779-84
- Gullo L (1999) *"Diabetes and the risk of pancreatic cancer"* Ann Oncol;10 Suppl 4:79-81
- Hartigan-O'Connor, D. J., C. Poon, E. Sinclair, and J. M. McCune (2007) *"Human CD4+ regulatory T cells express lower levels of the IL-7 receptor α chain (CD127), allowing consistent identification and sorting of live cells"* J. Immunol. Methods 319: 41–52
- Herrmann R, Bodoky G, Ruhstaller T, Glimelius B, Bajetta E, Schüller J, Saletti P, Bauer J, Figer A, Pestalozzi B, Köhne CH, Mingrone W, Stemmer SM, Tàmas K, Kornek GV, Koeberle D, Cina S, Bernhard J, Dietrich D, Scheithauer W. (2007) *"Gemcitabine plus capecitabine compared with gemcitabine alone in advanced pancreatic cancer: a randomized, multicenter, phase III trial of the Swiss Group for*

Clinical Cancer Research and the Central European Cooperative Oncology Group" J Clin Oncol 25: 2212-2217

Horak, I., J. Lohler, A. Ma, and K.A. Smith (1995) *"Interleukin-2 deficient mice: a new model to study autoimmunity and self-tolerance" Immunol Rev 148:35-44*

Hori, S., Nomura T. und Sakaguchi S. (2003) *"Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3" Science 299(5609): 1057-61*

Hsieh C.S., Lee H.M., Lio C.W. (2012) *"Selection of regulatory T cells in the thymus" Nat Rev Immunol. 12(3):157-67*

Huang B. et al. (2006) *"Gr-1CD115+ immature myeloid suppressor cells mediate the development of tumor-induced T regulatory cells and T-cell anergy in tumor-bearing host" Cancer Res. 66:1123-1131*

Huxley R, Ansary-Moghaddam A, Berrington de Gonzalez A, Barzi F, Woodward M. *"Type-II diabetes and pancreatic cancer: a meta-analysis of 36 studies" Br. J. Cancer 2005; 92:2076–83*

Janeway, C. A., Travers, P., Walport, M., Shlomchik, M. (2002). *"Immunologie"* Heidelberg/ Berlin, Spektrum Akademischer Verlag

Janeway, C. A., Jr., Carding, S., Jones, B., Murray, J., Portoles, P., Rasmussen, R., Rojo, J., Saizawa, K., West, J. und Bottomly, K. (1988) *"CD4+ T cells: specificity and function" Immunol Rev 101: 39-80*

Kelly D.M., Benjamin I.S. (1995) *"Pancreatic carcinoma" Ann Oncol 6(1):19-28*

Kessler (2005) *"Kleintieronkologie"* Parey Verlag, 2. Auflage

Kiessling, R., Petranyi, G., Karre, K., Jondal, M., Tracey, D. und Wigzell, H. (1976) *"Killer cells: a functional comparison between natural, immune T-cell and antibodydependent in vitro systems" J Exp Med 143(4): 772-80*

Kobie, J. J., Shah, P. R., Yang, L., Rebhahn, J. A., Fowell, D. J. und Mosmann, T. R. (2006) *"T regulatory and primed uncommitted CD4 T cells express CD73, which suppresses effector CD4 T cells by converting 5'-adenosine monophosphate to adenosine" J Immunol 177(10): 6780-6*

Kojima, A., Tanaka-Kojima Y., Sakakura T. and Nishizuka Y. (1976) *"Spontaneous development of autoimmune thyroiditis in neonatally thymectomized mice" Lab Invest 34:550-557*

König H.E., Liebich H.-G. (2002) "Anatomie der Haussäugetiere; Organe, Kreislauf- und Nervensystem" Schattauer Verlag, 2. Auflage

Krempien R., Heinemann V., Münter M., Harms W. & Debus J. (2004) "*Multimodale kurative/neoadjuvante Therapie beim Pankreaskarzinom*" Der Onkologe 10(12):1301-09

Lamb CR, Simpson KW, Boswood A, Matthewman LA. "Ultrasonography of pancreatic neoplasia in the dog: a retrospective review of 16 cases" Vet Rec 1995;137(3):65-68

Lanier L. L., Chang C., Azuma M., Ruitenberg J. J., Hemperly J. J. and Phillips J. H. (1991) "*Molecular and functional analysis of human natural killer cell-associated neural cell adhesion molecule (NCAM/CD56)*" J Immunol 146, 4421-6

Lee, A.J., T.B. Chiao, and M.P. Tsang (2005) "*Sildenafil for pulmonary hypertension*" Ann. Pharmacother. 39:869–884

Li D, Morris JS, Liu J *et al.* "*Body mass index and risk, age of onset, and survival in patients with pancreatic cancer*" JAMA 2009; 301:2553–62

Li, D., K. Xie, *et al.* (2004). "*Pancreatic cancer.*" Lancet 363(9414): 1049-57

Lim HW, Hillsamer P, Banham AH, Kim CH. (2005) "*Cutting edge: direct suppression of B cells by CD4+CD25+ regulatory T cells*" J Immunol. 2005;175:4180-4183

Liu, W., A. L. Putnam, Z. Xu-Yu, G. L. Szot, M. R. Lee, S. Zhu, P. A. Gottlieb, P. Kapranov, T. R. Gingeras, B. Fazekas de St. Groth, *et al.* (2006) "*CD127 expression inversely correlates with FoxP3 and suppressive function of human CD4+ Treg cells*" J. Exp. Med. 203: 1701–1711

Lowenfels AB, Maisonneuve P, Cavallini G *et al.* "*Pancreatitis and the risk of pancreatic cancer*" International Pancreatitis Study Group. N. Engl. J. Med. 1993; 328: 1433–7

Maisonneuve P, Lowenfels AB. "*Epidemiology of pancreatic cancer: an update*" Dig. Dis. 2010; 28: 645–56.

Maitra, A., Fukushima, N., Takaori, K., and Hruban, R.H. 2005 "*Precursors to invasive pancreatic cancer*" Adv. Anat. Pathol.12: 81–91

- Meyer C., Sevko A., Ramacher M., Bazhin A.V., Falk C.S., Osen W., Borrello I., Kato M., Schadendorf D., Baniyash M., Umansky V. (2011) "*Chronic inflammation promotes myeloid-derived suppressor cell activation blocking antitumor immunity in transgenic mouse melanoma model*" *Proc Natl Acad Sci U S A* 108(41):17111-6
- Morgan, M.E., J.H. van Bilsen, A.M. Bakker, B. Heemskerk, M.W. Schilham, F.C. Hartgers, B.G. Elferink, L. van der Zanden, R.R. de Vries, T.W. Huizinga, T.H. Ottenhoff and R.E. Toes (2005) "*Expression of FOXP3 mRNA is not confined to CD4+CD25+ T regulatory cells in humans*" *Hum Immunol* 66:13-20
- Morita Y, Takiguchi M, Yasuda J, Kitamura T, Syakalima M, Eom K, Hashimoto A. "Endoscopic ultrasonography of the pancreas in the dog" *Vet Radiol Ultrasound* 1998;39(6):552-556
- Moskaluk, C.A., Hruban, R.H., and Kern, S.E. (1997) "*p16 and K-ras gene mutations in the intraductal precursors of human pancreatic adenocarcinoma*" *Cancer Res.* 57: 2140–2143
- Mosmann, T. R. und Sad, S. (1996) "*The expanding universe of T-cell subsets: Th1, Th2 and more*" *Immunol Today* 17(3): 138-46
- Nakano, H., Yanagita, M. & Gunn, M.D. (2001) "*CD11c⁺B220⁺Gr-1⁺ cells in mouse lymphnodes and spleen display characteristics of plasmacytoid dendritic cells*" *J. Exp. Med.* 194, 1171-1178
- Neoptolemos J.P., Stocken D.D., Bassi C., Ghaneh P., Cunningham D., Goldstein D., Padbury R., Moore M.J., Gallinger S., Mariette C., Wente M.N., Izbicki J.R., Friess H., Lerch M.M., Dervenis C., Oláh A., Butturini G., Doi R., Lind P.A., Smith D., Valle J.W., Palmer D.H., Buckels J.A., Thompson J., McKay C.J., Rawcliffe C.L., Büchler M.W.; European Study Group for Pancreatic Cancer (2010) "Adjuvant chemotherapy with fluorouracil plus folinic acid vs gemcitabine following pancreatic cancer resection: a randomized controlled trial" *JAMA* 304(10):1073-81
- Norment, A. M., Salter, R. D., Parham, P., Engelhard, V. H. und Littman, D. R. (1988) "*Cell-cell adhesion mediated by CD8 and MHC class I molecules*" *Nature* 336(6194): 79-81
- O'Keeffe M, Hochrein H, Vremec D, Caminschi I, Miller JL, Anders EM, et al. (2002) "*Mouse plasmacytoid cells: long-lived cells, heterogeneous in surface phenotype and function, that differentiate into CD8(+) dendritic cells only after microbial stimulus*" *J Exp Med* 196(10):1307-19
- Pan, P.Y. et al. (2010) "*Immune stimulatory receptor CD40 is required for T-cell suppression and T regulatory cell activation mediated by myeloid-derived suppressor cells in cancer*" *Cancer Res.* 70, 99–108

Pandol S, Gukovskaya A, Edderkou M, Dawson D, Eibl G., Lugea A. *"Epidemiology, risk factors, and the promotion of pancreatic cancer: Role of the stellate cell"* J Gastroenterol Hepatol. 2012 Mar;27 Suppl 2:127-34

Parnes, J. R. (1989) *"Molecular biology and function of CD4 and CD8"* Adv Immunol 44: 265-311

Pellegata, N. S., F. Sessa, et al. (1994) *"K-ras and p53 gene mutations in pancreatic cancer: ductal and nonductal tumors progress through different genetic lesions"* Cancer Res 54(6): 1556-60

Petersen, G.M. and Hruban, R.H. 2003. *"Familial pancreatic cancer: Where are we in 2003?"* J. Natl. Cancer Inst. 95: 180–181

Queneau P.E., Adessi G.L., Thibault P., Cleau D., Heyd B., Manton G. und Carayon P. (2001) *"Early detection of pancreatic cancer in patients with chronic pancreatitis: diagnostic utility of a K-ras point mutation in the pancreatic juice"* Am J Gastroenterol 96(3):700-4

Raimondi S, Maisonneuve P, Lohr JM, Lowenfels AB. *"Early onset pancreatic cancer: evidence of a major role for smoking and genetic factors"* Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev. 2007; 16:1894–7

Riess H, Helm A, Niedergethmann M, Schmidt-Wolf I, Moik M, Hammer C, Zippel K, Weigang-Köhler K, Stauch M, Oettle M, Deutsche Krebsgesellschaft (2005) *"A Randomised, Prospective, Multicenter, Phase III Trial of Gemcitabine, 5-Fluorouracil (5-FU), Folinic Acid vs. Gemcitabine alone in Patients with Advanced Pancreatic Cancer"* ASCO Annual Meeting, Gastrointestinal Cancer, Pancreatic Cancer, Abstract No:4009

Robertson, M. J. and Ritz, J. (1990). *"Biology and clinical relevance of human natural killer cells"* Blood 76 (12):2421-38

Roncador G., Brown P.J., Maestre L., Hue S., Martinez-Torrecuadrada J.L., Ling K.L., Pratap S., Toms C., Fox B.C., Cerundolo V., Powrie F., Banham A.H. (2005) *"Analysis of FOXP3 protein expression in human CD4+CD25+ regulatory T cells at the single-cell level"* Eur J Immunol 35:1681-1691

Roncarolo, M.G., S. Gregori, M. Battaglia, R. Bacchetta, K. Fleischhauer, and M.K. Levings (2006) *"Interleukin-10-secreting type 1 regulatory T cells in rodents and Humans"* Immunol Rev 212:28-50

- Rozenblum, E., Schutte, M., Goggins, M., Hahn, S.A., Panzer, S., Zahurak, M., Goodman, S.N., Sohn, T.A., Hruban, R.H., Yeo, C.J., et al. (1997) "*Tumor-suppressive pathways in pancreatic carcinoma*" *Cancer Res.* 57: 1731–1734
- Rudensky, A.Y. (2011) "*Regulatory T cells and Foxp3*" *Immunol. Rev.* 241, 260-268
- Sakaguchi, S., Sakaguchi N., Asano M., Itoh M. und Toda M. (1995) "*Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases*" *J Immunol* 155(3): 1151-1164
- Sallusto F, Geginat J, Lanzavecchia A. (2004) "*Central memory and effector memory T cell subsets: function, generation, and maintenance*" *Annu Rev Immunol.* 22:745-763
- Sallusto, F., Lenig, D., Forster, R., Lipp, M. und Lanzavecchia, A. (1999) "*Two subsets of memory T lymphocytes with distinct homing potentials and effector functions*" *Nature* 401(6754): 708-12
- Sarfati, M., V. Mateo, S. Baudet, M. Rubio, C. Fernandez, F. Davi, J.L. Binet, J. Delic and H. Merle-Beral (2003) "*Sildenafil and vardenafil, types 5 and 6 phosphodiesterase inhibitors, induce caspase-dependent apoptosis of B-chronic lymphocytic leukemia cells*" *Blood.* 101:265–269
- Sato Y., Nio Y, Song M.M. et al. (1997) "*p53 protein expression as prognostic factor in human pancreatic cancer*" *Anticancer Res.* 17:2779-88
- Scheffold, A., K.M. Murphy, and T. Hofer (2007) "*Competition for cytokines: T(reg) cells take all*" *Nat Immunol* 8:1285-1287
- Schenk, M., Schwartz, A.G., O'Neal, E., Kinnard, M., Greenson, J.K., Fryzek, J.P., Ying, G.S., and Garabrant, D.H. 2001 "*Familial risk of pancreatic cancer*" *J. Natl. Cancer Inst.* 93:640–644
- Seddiki, N., B. Santner-Nanan, J. Martinson, J. Zaunders, S. Sasson, A. Landay, M. Solomon, W. Selby, S. I. Alexander, R. Nanan, et al. (2006) "*Expression of interleukin (IL)-2 and IL-7 receptors discriminates between human regulatory and activated T cells*" *J. Exp. Med.* 203: 1693–1700
- Serafini P, Borrello I, Bronte V (2006) "*Myeloid suppressor cells in cancer: recruitment, phenotype, properties, and mechanisms of immune suppression*" *Semin Cancer Biol* 6:53–65

- Serafini, P., De Santo, C., Marigo, I., Cingarlini, S., Dolcetti, L., Gallina, G., Zanovello, P. und Bronte, V. (2004) "*Derangement of immune responses by myeloid suppressor cells*" Cancer Immunol Immunother 53(2): 64-72
- Serafini, P., Meckel, K., Kelso, M., Noonan, K., Califano, J., Koch, W., Dolcetti, L., Bronte, V. und Borrello, I. (2006) "*Phosphodiesterase-5 inhibition augments endogenous antitumor immunity by reducing myeloid-derived suppressor cell function*" J Exp Med 203(12): 2691-702
- Serafini, P., Mgebroff, S., Noonan, K. und Borrello, I. (2008) "*Myeloid-derived suppressor cells promote cross-tolerance in B-cell lymphoma by expanding regulatory T cells*" Cancer Res 68(13): 5439-49
- Setter, S.M., J.L. Iltz, J.E. Fincham, R.K. Campbell, and D.E. Baker (2005) "*Phosphodiesterase 5 inhibitors for erectile dysfunction*" Ann. Pharmacother. 39:1286–1295
- Shevach, E.M. (2009) "Mechanisms of foxp3+ T regulatory cell-mediated suppression" Immunity 30, 636-645
- Shi Z., Tiwari A.K., Patel A.S., Fu L.W., Chen Z.S. (2011) "Roles of sildenafil in enhancing drug sensitivity in cancer" Cancer Res. 71(11):3735-8
- Siegal FP, Kadowaki N, Shodell M, Fitzgerald-Bocarsly PA, Shah K, Ho S, et al. (1999) "*The nature of the principal type 1 interferon-producing cells in human blood*" Science 284(5421):1835-7
- Siegel R., Ward E., Brawley O., Jemal A. "Cancer statistics, 2001" CA Cancer J Clin. 2001;51:23-48
- Siegal R., Ward E., Brawley O., Jemal A. "Cancer statistics, 2011" CA Cancer J Clin. 2011;61:212-236
- Silvermann DT, Dunn J.A., Hoover R.N. et al. (1994) "*Cigarette smoking and pancreas cancer: A case control study based on direct interviews*" J Natl Cancer Inst;86(20):1510-6
- Sohn TA, Yeo CJ, Cameron JL et al. (2000) "*Resected adenocarcinoma of the pancreas-616 patients: results, outcomes, and prognostic indicators*" J Gastrointest Surg 4: 567–79
- Spillmann, T., Happonen, I., Kahkonen, T., Fyhr, T., Westermarck, E. (2005a) "Endoscopic retrograde cholangio-pancreatography in healthy Beagles" Vet. Radiol. Ultrasound, 46, 97-104
- Squier, M. K. und Cohen, J. J. (1994) "*Cell-mediated cytotoxic mechanisms*" Curr Opin Immunol 6(3): 447-52

Suzuki, H., Y.W. Zhou, M. Kato, T.W. Mak, and I. Nakashima (1999) *"Normal regulatory alpha/beta T cells effectively eliminate abnormally activated T cells lacking the interleukin 2 receptor beta in vivo"* J Exp Med 190:1561-1572

Taguchi, O., Nishizuka Y. (1981) *"Experimental autoimmune orchitis after neonatal thymectomy in the mouse"* Clin Exp Immunol 46:425-434

Taguchi, O., Kojima A. and Nishizuka Y. (1985) *"Experimental autoimmune prostatitis after neonatal thymectomy in the mouse"* Clin Exp Immunol 60:123-129

Terabe, M., Matsui, S., Park, J. M., Mamura, M., Noben-Trauth, N., Donaldson, D. D., Chen, W., Wahl, S. M., Ledbetter, S., Pratt, B., Letterio, J. J., Paul, W. E. und Berzofsky, J. A. (2003) *"Transforming growth factor-beta production and myeloid cells are an effector mechanism through which CD1d-restricted T cells block cytotoxic T lymphocyte-mediated tumor immunosurveillance: abrogation prevents tumor recurrence"* J Exp Med 198(11): 1741-52

Tramacere I, Scotti L, Jenab M et al. *"Alcohol drinking and pancreatic cancer risk: a meta-analysis of the dose-risk relation"* Int.J. Cancer 2010; 126: 1474–86

Trzonkowski P, Szmit E, Mysliwska J, Dobyszek A, Mysliwski A. *"CD4+CD25+ T regulatory cells inhibit cytotoxic activity of T CD8+ and NK lymphocytes in the direct cell-to-cell interaction"* Clin Immunol. 2004;112:258-267

Umemura, N., Saio, M., Suwa, T., Kitoh, Y., Bai, J., Nonaka, K., Ouyang, G. F., Okada, M., Balazs, M., Adany, R., Shibata, T. und Takami, T. (2008) *"Tumorinfiltrating myeloid-derived suppressor cells are pleiotropic-inflamed monocytes/macrophages that bear M1- and M2-type characteristics"* J Leukoc Biol 83(5): 1136-44

Vignali, D. A., Collison, L. W. und Workman, C. J. (2008) *"How regulatory T cells work"* Nat Rev Immunol 8(7): 523-32

Viguier, M., F. Lemaitre, O. Verola, M.S. Cho, G. Gorochov, L. Dubertret, H. Bachelez, P. Kourilsky, and L. Ferradini (2004) *"Foxp3 expressing CD4+CD25(high) regulatory T cells are overrepresented in human metastatic melanoma lymph nodes and inhibit the function of infiltrating T cells"* J Immunol 173:1444-1453

Von Engelhardt W., Brevers G. (Eds) *"Physiologie der Haustiere"* Enke, Stuttgart 2005; p.380-405

Warshaw, A. L. and C. Fernandez-del Castillo (1992). *"Pancreatic carcinoma."* N Engl J Med 326(7): 455-65.

Wing, K. & Sakaguchi, S. (2010) *"Regulatory T cells exert checks and balances on self tolerance and autoimmunity"* Nature Immunol. 11, 7-13

Yeo T.P., Hruban R.H., Leach S.D., Wilentz R.E., Sohn T.A., Kern S.E., Iacobuzio-Donahue C.A., Maitra A., Goggins M., Canto M.I., Abrams R.A., Laheru D., Jaffee E.M., Hidalgo M. & Yeo C.J. (2002) "Pancreatic cancer" Curr Probl Cancer. 26(4):176-275

Youn Je-In, Nagaraj S., Collazo M. and Gabrilovich D.I. (2008) *"Subsets of Myeloid-Derived Suppressor Cells in Tumor-Bearing Mice"* J Immunol 181;5791-5802

IV. Tabellenverzeichnis

| | |
|---|----|
| Tabelle 2.1.1.1.: Mäuse..... | 29 |
| Tabelle 2.1.2.1.: Pankreaskarzinomzellen..... | 29 |
| Tabelle 2.1.3.1.: Anästhetika..... | 29 |
| Tabelle 2.1.4.1.: Nichtsteroidale Antiphlogistika..... | 29 |
| Tabelle 2.1.5.1.: Antikörper für die Durchflusszytometrie ("anti-mouse")..... | 29 |
| Tabelle 2.1.6.1.: Antikörper für die Durchflusszytometrie ("anti-human")..... | 30 |
| Tabelle 2.1.7.1.: Streptavidin für die Durchflusszytometrie..... | 32 |
| Tabelle 2.1.8.1.: Laborgeräte..... | 32 |
| Tabelle 2.1.9.1.: Verbrauchsmaterialien..... | 33 |
| Tabelle 2.1.10.1.: Chemikalien..... | 33 |
| Tabelle 2.1.12.1.: Software..... | 35 |

V. Abbildungsverzeichnis

| | | |
|--------------------|---|----|
| Abbildung 1.2.3.1. | Einteilung der Stadien des Pankreaskarzinoms anhand der TNM-Klassifikation..... | 24 |
| Abbildung 2.2.5.1. | Prinzip der Dichtegradienten-Zentrifugation..... | 39 |
| Abbildung 3.1.1.1. | Effekte der Behandlung mit Sildenafil auf das Überleben der Mäuse mit Pankreaskarzinom..... | 42 |
| Abbildung 3.1.2.1. | Effekte der Behandlung mit Sildenafil auf Tumolvolumen und Tumorgöße der Mäuse mit Pankreaskarzinom..... | 43 |
| Abbildung 3.1.3.1. | Effekte der Behandlung mit Sildenafil auf die Metastasierungsrate der Mäuse mit Pankreaskarzinom..... | 44 |
| Abbildung 3.2.1. | Auswertestrategie zur durchflusszytometrischen Bestimmung von T-Lymphozyten im Primärtumor..... | 45 |
| Abbildung 3.2.2. | Quantifizierung der Lymphozytenpopulationen in Primärtumoren tumortragender Mäuse mit und ohne Sildenafilbehandlung mittels FACS..... | 46 |
| Abbildung 3.2.3. | Quantifizierung von CD4 ⁺ T-Zellen und deren Subpopulationen in Primärtumoren tumortragender weiblicher und männlicher Mäuse mit und ohne Sildenafilbehandlung..... | 47 |
| Abbildung 3.2.4. | Quantifizierung von CD8 ⁺ T-Zellen und deren Subpopulationen in Primärtumoren tumortragender weiblicher und männlicher Mäuse mit und ohne Sildenafilbehandlung..... | 48 |
| Abbildung 3.2.5. | Auswertestrategie zur durchflusszytometrischen Bestimmung von regulatorischen T-Zellen sowie NK- und NK-T-Zellen im Primärtumor..... | 49 |
| Abbildung 3.2.6. | Quantifizierung von regulatorischen T-Zellen und deren Subpopulationen sowie NK- und NK-T-Zellen in Primärtumoren tumortragender Mäuse mit und ohne Sildenafilbehandlung..... | 50 |
| Abbildung 3.2.7. | Quantifizierung von regulatorischen T-Zellen und deren Subpopulationen sowie NK- und NK-T-Zellen in Primärtumoren tumortragender weiblicher und männlicher Mäuse mit und ohne Sildenafilbehandlung..... | 51 |

| | | |
|-------------------|---|----|
| Abbildung 3.2.8. | Auswertestrategie zur durchflusszytometrischen Bestimmung von MDSC im Primärtumor..... | 52 |
| Abbildung 3.2.9. | Quantifizierung von MDSC und deren beiden Subpopulationen in Primärtumoren tumortragender Mäuse mit und ohne Sildenafilbehandlung..... | 53 |
| Abbildung 3.2.10. | Quantifizierung von MDSC und deren beiden Subpopulationen in Primärtumoren tumortragender weiblicher und männlicher Mäuse mit und ohne Sildenafilbehandlung.. | 54 |
| Abbildung 3.2.11. | Auswertestrategie zur durchflusszytometrischen Bestimmung von dendritischen Zellen im Primärtumor..... | 55 |
| Abbildung 3.2.12. | Quantifizierung von dendritischen Zellen in Primärtumoren tumortragender Mäuse mit und ohne Sildenafilbehandlung.. | 56 |
| Abbildung 3.2.13. | Quantifizierung von dendritischen Zellen in Primärtumoren tumortragender weiblicher und männlicher Mäuse mit und ohne Sildenafilbehandlung..... | 57 |
| Abbildung 3.2.14. | Bestimmung der mittleren Fluoreszenzintensität von dendritischen Zellen in Primärtumoren tumortragender weiblicher und männlicher Mäuse mit und ohne Sildenafilbehandlung..... | 58 |
| Abbildung 3.3.1. | Auswertestrategie zur Bestimmung von CD4 ⁺ T-Lymphozyten aus der Milz von gesunden Mäusen mittels FACS..... | 59 |
| Abbildung 3.3.2. | Quantifizierung der Lymphozytenpopulationen aus der Milz gesunder Mäuse mit und ohne Sildenafilbehandlung mittels FACS..... | 60 |
| Abbildung 3.3.3. | Quantifizierung von CD4 ⁺ T-Zellen und deren Subpopulationen aus der Milz gesunder weiblicher und männlicher Mäuse mit und ohne Sildenafilbehandlung..... | 61 |
| Abbildung 3.3.4. | Quantifizierung von CD8 ⁺ T-Zellen und deren Subpopulationen aus der Milz gesunder weiblicher und männlicher Mäuse mit und ohne Sildenafilbehandlung..... | 62 |
| Abbildung 3.3.5. | Quantifizierung von regulatorischen T-Zellen und deren Subpopulationen sowie NK- und NK-T-Zellen aus der Milz gesunder Mäuse mit und ohne Sildenafilbehandlung..... | 63 |
| Abbildung 3.3.6. | Quantifizierung von regulatorischen T-Zellen und deren Subpopulationen sowie NK- und NK-T-Zellen aus der Milz gesunder weiblicher und männlicher Mäuse mit und ohne Sildenafilbehandlung..... | 64 |

| | | |
|-------------------|--|----|
| Abbildung 3.3.7. | Quantifizierung von Gr-1 ⁺ CD11b ⁺ Zellen und deren Subpopulationen aus der Milz gesunder weiblicher und männlicher Mäuse mit und ohne Sildenafilbehandlung..... | 65 |
| Abbildung 3.3.8. | Quantifizierung von dendritischen Zellen aus der Milz gesunder Mäuse mit und ohne Sildenafilbehandlung..... | 66 |
| Abbildung 3.3.9. | Quantifizierung von dendritischen Zellen aus der Milz gesunder weiblicher und männlicher Mäuse mit und ohne Sildenafilbehandlung..... | 67 |
| Abbildung 3.3.10. | Bestimmung der mittleren Fluoreszenzintensität von dendritischen Zellen aus der Milz gesunder weiblicher und männlicher Mäuse mit und ohne Sildenafilbehandlung..... | 68 |
| Abbildung 3.4.1. | Auswertestrategie zur durchflusszytometrischen Bestimmung von T-Lymphozyten aus peripheral Blut von gesunden Probanden nach Kultivierung mit Sildenafil..... | 70 |
| Abbildung 3.4.2. | Quantifizierung von CD4 ⁺ T-Zellen und deren Subpopulationen aus peripheral Blut von gesunden Probanden nach Kultivierung mit Sildenafil..... | 71 |
| Abbildung 3.4.3. | Quantifizierung von CD8 ⁺ T-Zellen und deren Subpopulationen aus peripheral Blut von gesunden Probanden nach Kultivierung mit Sildenafil..... | 72 |
| Abbildung 3.4.4. | Auswertestrategie zur Bestimmung von regulatorischen T-Zellen aus peripheral Blut von gesunden Probanden nach Kultivierung mit Sildenafil..... | 73 |
| Abbildung 3.4.5. | Quantifizierung von regulatorischen T-Zellen und deren Subpopulationen aus peripheral Blut von gesunden Probanden nach Kultivierung mit Sildenafil..... | 74 |
| Abbildung 3.4.6. | Quantifizierung von CD39 ⁺ und CD73 ⁺ auf regulatorischen T-Zellen und deren Subpopulationen aus peripheral Blut von gesunden Probanden nach Kultivierung mit Sildenafil..... | 75 |
| Abbildung 3.4.7. | Auswertestrategie zur durchflusszytometrischen Bestimmung der beiden Zellpopulationen CD14 ⁺ HLA-DR ^{low} und CD14 ⁻ HLA-DR ⁻ aus peripheral Blut von gesunden Probanden nach Kultivierung mit Sildenafil..... | 76 |
| Abbildung 3.4.8. | Quantifizierung der beiden Zellpopulationen CD14 ⁺ HLA-DR ^{low} und CD14 ⁻ HLA-DR ⁻ aus peripheral Blut von gesunden Probanden nach Kultivierung mit Sildenafil..... | 76 |

| | | |
|--------------------|---|----|
| Abbildung 3.4.9. | Auswertestrategie zur Bestimmung von Monozyten und dendritischen Zellen aus peripheral Blut von gesunden Probanden nach Kultivierung mit Sildenafil..... | 77 |
| Abbildung 3.4.10. | Quantifizierung von Monozyten und dendritischen Zellen aus peripheral Blut von gesunden Probanden nach Kultivierung mit Sildenafil..... | 78 |
| Abbildung 3.5.1.1. | Effekte der Behandlung mit Sildenafil und Gem auf das Überleben der Mäuse mit Pankreaskarzinom..... | 80 |
| Abbildung 3.5.2.1. | Effekte der Behandlung mit Sildenafil und Gem auf das Tumolvolumen der Mäuse mit Pankreaskarzinom... | 81 |
| Abbildung 3.5.3.1. | Effekte der Behandlung mit Sildenafil und Gem auf die Metastasierungsrate der Mäuse mit Pankreaskarzinom..... | 82 |
| Abbildung 3.6.1. | Quantifizierung der Lymphozytenpopulationen in Primärtumoren tumortragender Mäuse nach der Behandlung mit Sildenafil und Gem..... | 83 |
| Abbildung 3.6.2. | Quantifizierung von regulatorischen und konventionellen T-Zellen sowie NK- und NK-T-Zellen in Primärtumoren tumortragender Mäuse nach der Behandlung mit Sildenafil und Gem..... | 84 |
| Abbildung 3.6.3. | Quantifizierung von MDSC und deren beiden Subpopulationen in Primärtumoren tumortragender Mäuse nach der Behandlung mit Sildenafil und Gem..... | 85 |
| Abbildung 3.6.4. | Quantifizierung von dendritischen Zellen in Primärtumoren tumortragender Mäuse nach der Behandlung mit Sildenafil und Gem..... | 86 |
| Abbildung 3.6.5. | Quantifizierung von dendritischen Zellen in Primärtumoren tumortragender weiblicher und männlicher Mäuse nach der Behandlung mit Sildenafil und Gem..... | 87 |
| Abbildung 3.6.6. | Bestimmung der mittleren Fluoreszenzintensität von dendritischen Zellen in Primärtumoren tumortragender weiblicher und männlicher Mäuse nach der Behandlung mit Sildenafil und Gem..... | 88 |

VI. Danksagungen

An dieser Stelle möchte ich all jenen Menschen von Herzen danken, die zum Gelingen dieser Arbeit maßgeblich beigetragen haben und mir bei all meinen großen Herausforderungen stets zur Seite standen, allen voran...

Meinem Betreuer Prof. Dr. Alexandr V. Bazhin danke ich für die Bereitstellung dieses interessanten Themas und seine intensive Betreuung und gute Zusammenarbeit in jeder Phase meiner Arbeit.

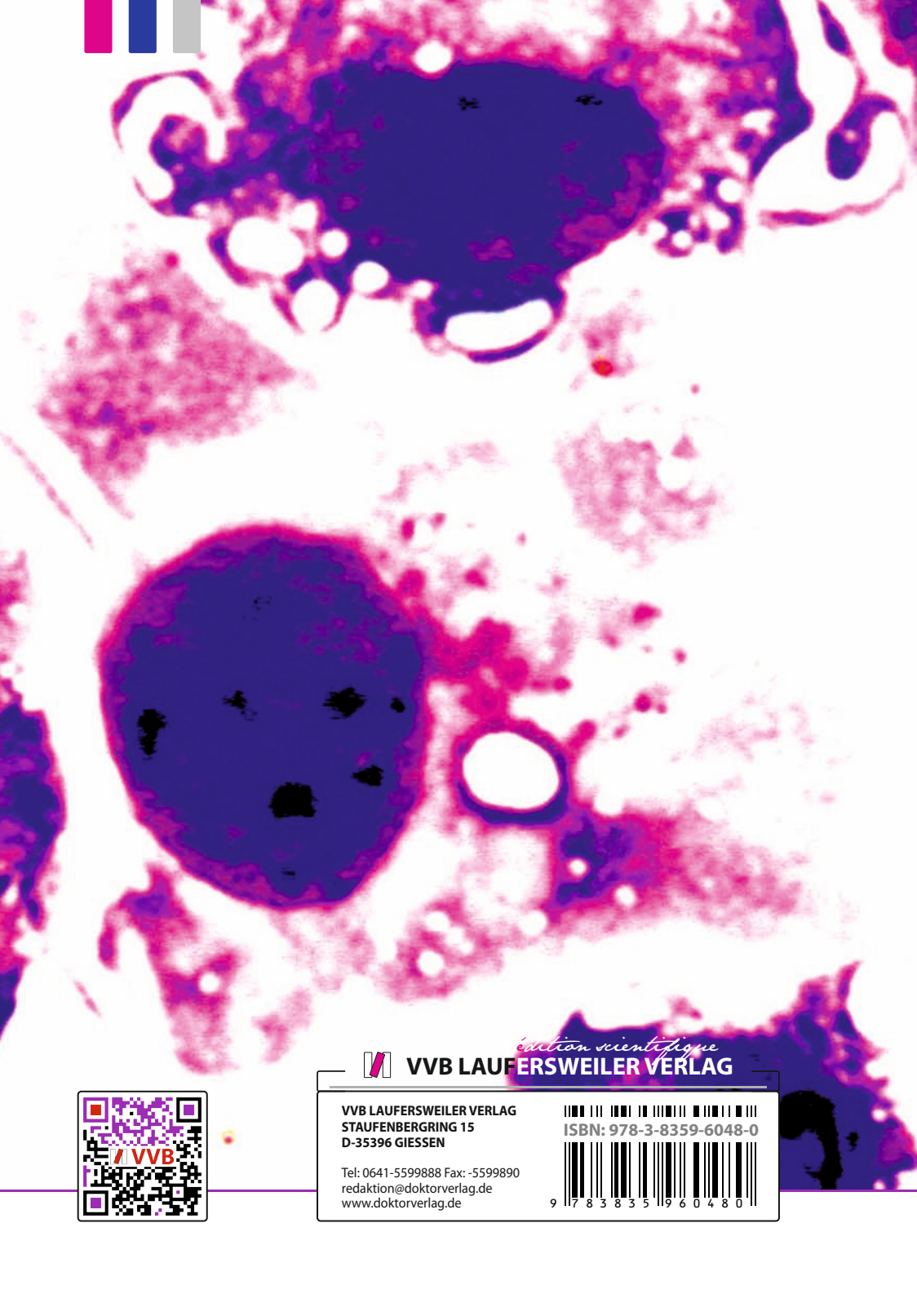
Herrn Prof. Dr. Andreas Moritz, vom Klinikum Veterinärmedizin in Gießen danke ich für die freundliche Übernahme der Betreuung dieser Arbeit am Fachbereich.

Weiter möchte ich mich bei Frau Dr. Svetlana Karakhanova und Frau Dr. Sabine Soltek bedanken, die immer ein offenes Ohr für Fragen hatten und mich bei jeglichen Problemen und der Durchführung meiner Projekte unterstützten sowie für die liebevolle und intensive Betreuung meiner Mäuschen.

Meinen Kollegen, insbesondere Dr. Yuhui Yang, Robert Ose und Ivan Shevchenko danke ich für das allseits freundschaftliche und lustige Arbeitsklima, die gute Einarbeitung und die immergewährte große Hilfsbereitschaft zu jeder Tages- und Nachtzeit.

Von ganzem Herzen möchte ich mich bei meinen großartigen Eltern für ihre liebevolle Unterstützung und Fürsorge bedanken, die sie mir in all meinen Jahren gegeben haben, dass sie immer für mich da waren und ohne die dieser Weg nicht möglich gewesen wäre.

Ganz besonders danke ich Michi für seine unendlich große Liebe und Unterstützung, die er mir in all der schwierigen Zeit geschenkt hat und für die schönen Momente und die Geborgenheit, die mir stets Freude und Kraft gegeben haben, an mich zu glauben und nicht aufzugeben.



redaktion scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

VVB LAUFERSWEILER VERLAG
STAUFENBERGRING 15
D-35396 GIESSEN

Tel: 0641-5599888 Fax: -5599890
redaktion@doktorverlag.de
www.doktorverlag.de

ISBN: 978-3-8359-6048-0



9 783835 196048 0

